

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de marcadores genéticos e inmunitarios  
relacionados con inmunoterapia en cáncer gástrico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ignacio Juárez Martín-Delgado**

DIRECTORES

**José Manuel Martín Villa**  
**George C. Tsokos**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS E INMUNITARIOS RELACIONADOS CON  
INMUNOTERAPIA EN CÁNCER GÁSTRICO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

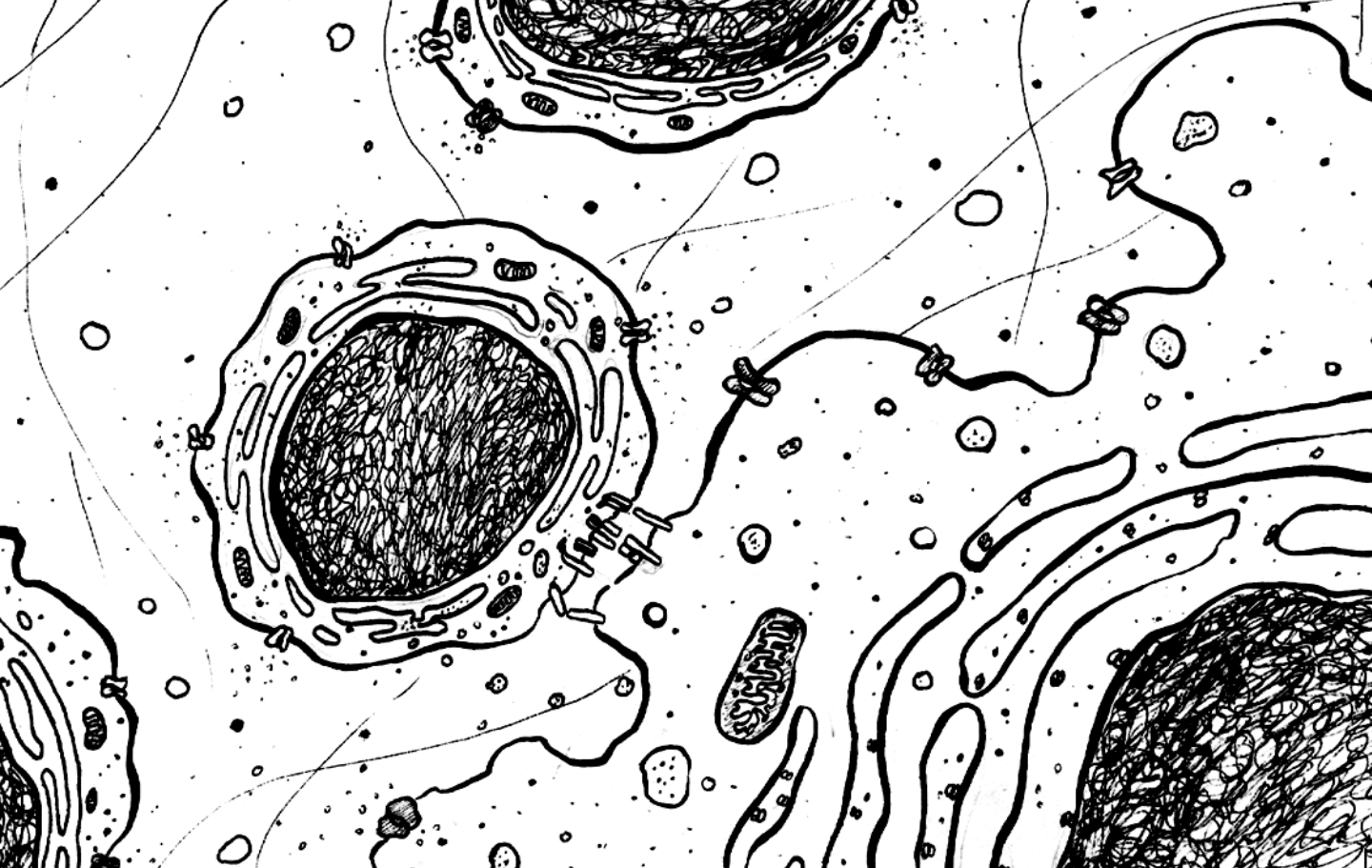
PRESENTADA POR

Ignacio Juárez Martín-Delgado

DIRECTOR

José Manuel Martín Villa  
George C. Tsokos





**ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS E  
INMUNITARIOS RELACIONADOS CON INMUNOTERAPIA  
EN CÁNCER GÁSTRICO**

**TESIS DOCTORAL**

**IGNACIO JUÁREZ MARTÍN-DELGADO**

**FACULTAD DE MEDICINA – UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL**

**DIRECTORES:**

**JOSÉ MANUEL MARTÍN VILLA**

**GEORGE C. TSOKOS**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**





*“El billete hacia el futuro  
siempre está en blanco”*





# **AGRADECIMIENTOS**

No es mal momento de echar la vista atrás. Y si ahora mismo alguien me preguntara si ha merecido la pena, y si repetiría estos seis años sabiendo el camino que he recorrido hasta aquí, la respuesta es clara: Sí. Y eso se debe en gran medida a la gente que ha estado a mi lado durante este periodo, y para quienes van dirigidos estos agradecimientos.

Podría empezar a agradecer por muchos sitios (familia, amigos, compañeros...), pero creo que es de recibo empezar por aquí.

A mi director de tesis, José Manuel Martín Villa, Manolo. El día que escribo estas líneas se cumplen prácticamente seis años desde que nos conocimos, sin saber que me esperaban seis años del mejor tutor, director de tesis y jefe que podría haber imaginado. Tu manera de confiar y apoyar a cualquiera de los estudiantes que pasan por el laboratorio, entre los que me incluyo, son motivo más que suficiente para hacer a cualquiera alumno luchar con uñas y dientes para quedarse durante todo el tiempo posible. Ambos sabemos que, especialmente al inicio de mi doctorado, hubo momentos inciertos, en los que llegué a pensar que, como a otros antes, me tocaría dejar ese laboratorio que tan buenos momentos me había dado en relativamente poco tiempo.

Y fue gracias a tu empeño, confianza y apoyo (y un poco de suerte) que aquella última esperanza (que llegué a pensar inalcanzable) se materializó en la seguridad y la fuerza suficientes para llegar al momento de hoy, a poder escribir estos agradecimientos, y las otras 157 páginas que componen esta tesis doctoral. Por tus consejos, tu apoyo, tu comprensión, tanto a nivel profesional como personal (y por los innumerables cafés a los que me has invitado por las mañanas): de corazón, gracias.

A mi familia, papá, mamá y Carlos, que aun sin tener muy claro cómo funcionaba esto de una tesis doctoral, nunca han dejado de preocuparse, preguntar y tratar de comprender, más o menos, a que me dedicaba de lunes a viernes desde por la mañana hasta bien entrada la tarde. Por apoyarme, a todos los niveles, especialmente ese primer año de doctorado a la espera de una beca. Por preguntarme cada final de curso por “las notas” (sí, este año hay notas), por querer comprar todas las revistas y libros en las que hubiera salido mi nombre, por pequeñito y esquinado que estuviera. Y por llamar, por mucho que a mí se me fuera de la cabeza, aunque no tuviéramos realmente nada que contarnos. Gracias.

Este es el apartado más difícil de todos. No porque sea el que menos quiero escribir, sino porque es bastante fácil dejarme algún nombre. Si alguno se me escapa, y cree que debería estar por aquí, que no lo dude, se me ha pasado... A mis compañeros y amigos del departamento de Inmunología de la UCM, los que se fueron (Patricia, Rocío, Maleny, Anaïs, Óscar, Cris, Irene, Aldara), y los que están

(Sergio, Álex, Marta, José Luis, Óscar “Illo”, Bea “Truchi”, Rebeca, Héctor, Arantza), todos merecéis unos agradecimientos individuales, pero me temo que tendré que resumir un poco. Hemos pasado por una mudanza de despachos, una obra, incontables prácticas e innumerables cafés, y hasta una pandemia. Gracias por ser un departamento al que apetece volver cada lunes, por no irnos sin despedirse antes de unas vacaciones y saludar el primer día a la vuelta. Por traer algo el día del cumpleaños, pero no por cumplir, sino por gusto. Por ayudar siempre que lo he necesitado, y por pedir ayuda cuando podía ser útil. A todos, gracias.

Por supuesto, hay un par de nombres que necesitan un poco más de espacio:

A mi amiga y compañera (hasta de cargo) Bea. Empezamos casi a la vez, y casi como siameses hemos pasado juntos por todos los altibajos que suponen una tesis, el trabajo de laboratorio y hasta los Consejos de Departamento. Congresos, tesis, bodas y, por muy poquito no llegamos a compartir meses de estancia. No hay que ser especialmente listo u observador para saber que tienes un futuro brillante, independientemente de lo que elijas, y que a quien le toques de compañero tendrá la mejor de las suertes, como tenemos todos en el departamento.

A Ana, *Anavi* (lo siento, así te presentaron cuando te conocí). Por si no fuera suficiente estar pared con pared en el laboratorio y codo con codo en el escritorio, tuviste la mala suerte de tener que acompañarme durante tres meses de estancia. Y por si fuera poco, compartiendo no solo casa, sino un cuarto de tamaño estándar. Aparte de las bromas, gracias por tu simpatía, por compartir tus amplios conocimientos científicos y técnicos, por compartir tu vitalidad con todo el departamento y por aquel abrazo el día que te enteraste de que me darían la beca.

He querido guardar un párrafo para mis compañeros de laboratorio, los orgullosos miembros del grupo AUTO:

Juan. Fuiste mi primer compañero de laboratorio, y no pude tener un mejor primer compañero. Serán difíciles de olvidar las carcajadas, tu ácido sentido del humor, a Elvis en el laboratorio y “Radio Regenbogen” dando el parte a las cuatro de la tarde. Y ya sabes que, aunque tomaras un camino apartado de la ciencia, siempre puedes contar conmigo para lo que necesites, como yo cuento contigo.

Christian. Veo en ti la ilusión y las ganas que tenía yo hará seis años, cuando entré al departamento. Y, aunque compartamos gustos y aficiones, son precisamente esa ilusión y ganas de trabajar las que me hacen confiar en ti, y me animan a olvidarme de mis *deadlines* por un momento, soltar el teclado del ordenador y pasarme por el laboratorio y ponerme al día sobre tus experimentos, análisis, lecturas de artículos o que nueva serie debería ver en la temporada de anime de otoño. Espero de todo corazón que todo lo que te propongas se cumpla, y poder ayudarte en todo lo que sea necesario para que así sea.

A mis amigos de siempre: Lara, Charly, Guille, Marcus, Galiana, Ángel, Guti, Heidi, Manu, y todos los nombres de los que me haya podido olvidar. Si todo va bien a partir de este punto, todo parece indicar que, efectivamente, van a dejar que sea doctor. Gracias por las cervezas compartidas, las escasas vacaciones conjuntas, las conversaciones que, por supuesto, arreglarían el mundo, y por las contadas ocasiones (cuando realmente era necesario, en realidad) en las que confiabais en la opinión de un científico. Quiero hacer una mención especial a Parlo, que ya fuera por compatibilidad de horarios nocturnos, exceso de confianza o sincera preocupación, estuviste cerca hasta en mis más solitarias noches de estancia.

To the people of Tsokos' lab at Beth Israel Deaconess Medical Center: My co-director, George, for bring me the opportunity to get the grant that made all of this possible and welcome me to your lab. To Vaishali, for keep counting on me even when I couldn't work in the lab. To all the postdoc people of the lab: Cata, Eri, Ryo, Nobu, Hao, Wenliang, Abi, Shi; for your warm welcome, kindness and support during my stay at Boston. To Masa, for your scientific help, your unconditional friendship and the escapes at 6pm. And, a special apart, to my dear partner and friend, Taka. Thank you from the bottom of my hearth for your guidance, teaching (that includes scientific stuff, history of Japan, baseball and much more), trust and help. You will always have a home in Spain for you and your family.

Y, finalmente, a María. ¿Dónde si no en las últimas líneas? Tú podrías entrar en casi cualquiera de los agradecimientos anteriores: Eres parte de mi familia, fuiste mi compañera de laboratorio, eres mi amiga, y apuntito estuviste de ser mi compañera de cuarto durante una breve temporada en Boston. Gracias por estar ahí desde cuatro años antes de comenzar esta andadura, por no dejarme trabajar hasta tarde, y por dejarme trabajar hasta tarde, depende del día. Gracias por dejarme dormir los días de más cansancio, y por no dejarme dormirme en los laureles cuando era necesario. Por eso y por mil motivos más, gracias.



# ÍNDICE

---

ÍNDICE .....	1
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	24
1.    Cáncer .....	25
2.    Características del cáncer .....	26
2.1.        Mantenimiento de señales de proliferación .....	26
2.2.        Evasión de supresores de la proliferación.....	26
2.3.        Resistencia a la muerte celular .....	27
2.4.        Inmortalidad replicativa .....	27
2.5.        Inducción de angiogénesis .....	28
2.6.        Invasión y metástasis .....	28
2.7.        Inestabilidad genómica y mutación .....	29
2.8.        Inflamación pro-tumoral .....	29
2.9.        Reprogramación del metabolismo energético.....	30
2.10.        Evasión de la respuesta inmunitaria .....	30
3.    Inmunoección .....	32
3.1.        Eliminación .....	32
3.2.        Equilibrio .....	33
3.3.        Escape.....	34
4.    Evidencias del proceso de inmunoección .....	38
4.1.        Evidencias experimentales de la inmunovigilancia en animales .....	38
4.2.        Evidencias observacionales de inmunovigilancia en humanos .....	39
5.    Inmunoterapia del cáncer .....	41
5.1.        Administración de interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) .....	41

5.2.	Terapia con virus oncolíticos .....	41
5.3.	Anticuerpos monoclonales .....	42
5.4.	Vacunas contra el cáncer .....	43
5.5.	Bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario .....	44
6.	Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y vía de las SMAD 48	
7.	Cáncer gástrico .....	52
7.1.	Clasificación de los tumores gástricos .....	52
7.2.	Respuesta inmunitaria en el cáncer gástrico .....	54
	Cáncer gástrico e Inmunoterapia .....	54
8.	TGF- $\beta$ 1 y cáncer gástrico .....	55
9.	HER2 y cáncer gástrico .....	56
9.1.	HER2: Molécula y señalización en cáncer .....	56
9.2.	HER2 en la clínica .....	57
9.3.	HER2 en cáncer gástrico .....	58
10.	Inmunoterapia en cáncer gástrico .....	59
10.1.	Anticuerpos anti-HER2 en cáncer gástrico .....	59
10.2.	Inhibidores de puntos de control en cáncer gástrico .....	59
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	61
1.	Polimorfismos de <i>TGFB1</i> y cáncer gástrico .....	62
2.	Amplificaciones de HER2 y cáncer gástrico .....	62
3.	Fenotipado de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo y técnicas de inmunohistoquímica en cáncer gástrico .....	63
	MATERIAL Y MÉTODOS .....	65
1.	MUESTRAS .....	66
1.1.	Pacientes .....	66
1.2.	Tejidos .....	66
1.3.	Sangre .....	69
2.	MÉTODOS HISTOLOGÍA – INMUNOHISTOQUÍMICA .....	70



2.1.	Obtención de cortes de tejido .....	70
2.2.	Marcaje de cortes histológicos con anticuerpos.....	70
2.3.	Revelado de peroxidasa y montaje de los cortes .....	71
2.4.	Toma de imágenes y análisis de las tinciones.....	72
3.	MÉTODOS BIOLOGIA CELULAR.....	73
3.1.	Citometría de flujo .....	73
3.2.	Estimulación de linfocitos y expresión de citoquinas .....	77
4.	MÉTODOS BIOLOGÍA MOLECULAR.....	78
4.1.	Aislamiento y purificación de ADN genómico .....	78
4.2.	Determinación de polimorfismos genéticos .....	79
4.3.	Determinación de amplificaciones genéticas .....	82
	RESULTADOS.....	86
1.	Polimorfismos del gen <i>TGFB1</i> y cáncer gástrico .....	87
1.1.	Relación de alelos y desarrollo de cáncer gástrico.....	90
1.2.	Relación de los haplotipos extendidos y desarrollo y evolución del cáncer gástrico .....	92
1.3.	Polimorfismos de <i>TGFB1</i> y expresión de TGF- $\beta$ 1 .....	94
1.4.	Polimorfismos de <i>TGFB1</i> y supervivencia de los pacientes .....	96
1.5.	Niveles de TGF- $\beta$ 1 circulantes, progresión de la enfermedad y supervivencia. ....	98
2.	Amplificaciones genéticas de <i>HER2</i> en cáncer gástrico .....	100
2.1.	Determinación de punto de corte (cut-off) estandarizado de la ratio <i>HER2/IFNG</i> .....	101
2.2.	Análisis de amplificaciones genéticas de <i>HER2</i> mediante PCR diferencial .....	101
2.3.	Análisis de amplificaciones genéticas de <i>HER2</i> mediante PCR cuantitativa .....	103

2.4. Sobreexpresión de la proteína HER2 en tumores gástricos: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....	106
3. Estudio de poblaciones CD8, PD1 y expresión de PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico.....	107
3.1. Fenotipado de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo	107
3.2. Determinación de CD8, PD1 y PDL1 por técnicas de inmunohistoquímica .....	113
3.3. Estructuras Linfoides Terciarias (TLS).....	118
3.4. Análisis de correlación .....	120
DISCUSIÓN .....	121
1. Polimorfismos del gen <i>TGFB1</i> y cáncer gástrico .....	122
1.1. Variantes polimórficas del gen <i>TGFB1</i> como marcadores para el desarrollo y la evolución del cáncer gástrico .....	122
1.2. Polimorfismos del gen <i>TGFB1</i> y tasas de supervivencia.....	124
1.3. Expresión de TGF- $\beta$ 1 y evolución del cáncer gástrico .....	126
2. Amplificaciones genéticas de HER2 en cáncer gástrico.....	128
3. Estudio de poblaciones CD8, PD1 y tumores PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico.....	129
3.1. Células CD8 y PD1 en sangre periférica y tejido de pacientes con cáncer gástrico .....	130
3.2. Expresión de PDL1 en cáncer gástrico.....	133
3.3. Estructuras linfoides terciarias en cáncer gástrico.....	133
CONCLUSIONES .....	136
Polimorfismos del gen <i>TGFB1</i> y cáncer gástrico .....	137
Amplificaciones genéticas de HER2 en cáncer gástrico .....	137
Estudio de poblaciones CD8, PD1 y expresión de PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico .....	137
CONCLUSIONS.....	138
<i>TGFB1</i> gene polymorphisms and gastric cancer .....	139
Genetic amplification of HER2 in gastric cancer .....	139

Study of CD8, PD1 and PDL1 expression populations in peripheral blood, stomach and tumors of gastric cancer patients .....	139
REFERENCIAS .....	140
ANEXOS .....	154
1. <i>Curriculum vitae (Formato CVN FECYT)</i> .....	155
2. <i>Artículos como primer autor (enviados para su publicación) .....</i>	155

# **RESUMEN**

---

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial con una serie de características definitorias: mantenimiento de las señales de proliferación, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, motilidad y metástasis, inestabilidad genómica y mutación, inflamación pro-tumoral, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral.

Como parte de esta última característica, destaca la implicación del sistema inmunitario en la respuesta antitumoral, siguiendo un proceso denominado inmunoección, que se compone de tres fases: eliminación del tumor por parte del sistema inmunitario, equilibrio entre la respuesta inmunitaria y los mecanismos supresores del tumor y, finalmente, escape del tumor e invasión de tejidos adyacentes y distales.

El cáncer gástrico es el quinto tipo de tumor más frecuente en la población mundial, con más de un millón de muertes anuales en todo el mundo. Es uno de los tumores con mayor prevalencia de mutaciones somáticas, lo que facilita la formación de neo-antígenos tumorales y hace susceptible estos tumores para su tratamiento con diversos tipos de inmunoterapia.

La inmunoterapia comprende una serie de tratamientos que promueven la estimulación del sistema inmunitario tendentes a la prevención o tratamiento de una enfermedad. La inmunoterapia contra el cáncer tiene como objetivo el bloqueo de vías de señalización pro-tumorales, así como la estimulación (directa o indirecta) de la respuesta

inmunitaria contra los tumores. En el caso concreto del cáncer gástrico, el tratamiento con anticuerpos bloqueantes de HER2 (trastuzumab) se emplea en pacientes HER+, mientras que los inhibidores de puntos del control del sistema inmunitaria únicamente están aprobados para el tratamiento de pacientes en estadios muy avanzados de la enfermedad, con enfermedad diseminada, y refractarios a quimio y radioterapia. La dificultad para el tratamiento de estos pacientes radica en la correcta determinación de biomarcadores que identifiquen a pacientes susceptibles de recibir inmunoterapia.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Debido a la necesidad de obtener biomarcadores, este trabajo tiene como objetivo el estudio de marcadores relacionados con el sistema inmunitario y la inmunoterapia en el cáncer gástrico. Se trabajó en tres líneas de investigación:

- Polimorfismos del gen *TGFB1* y cáncer gástrico: Con la hipótesis de que las variantes del gen *TGFB1*, relacionadas con la expresión de TGF- $\beta$ 1, podían afectar al desarrollo y la evolución de los tumores gástricos, estudiamos la frecuencia de distribución de cuatro polimorfismos de base única (rs1800468, rs1800469, rs1800470 y rs1800471) en pacientes con cáncer gástrico en función de su tipo tumoral y su supervivencia. Además, determinamos los niveles de TGF- $\beta$ 1 en el plasma de pacientes con cáncer gástrico y su relación con la supervivencia de estos pacientes.
- Amplificaciones del gen *HER2* en cáncer gástrico: Los pacientes con cáncer gástrico pueden presentar amplificaciones del gen *HER2* en sus tumores primarios, si bien las técnicas para detectar estas amplificaciones y la expresión de HER2 adolecen de falsos positivos y negativos con alta

frecuencia. Por ello, quisimos utilizar técnicas de biología molecular para la detección de amplificaciones del gen *HER2* en muestras procedentes de pacientes con cáncer gástrico.

- Infiltrados de células CD8, PD1 y expresión de PDL1 en cáncer gástrico.  
La inmunoterapia dirigida contra PD1 en tumores sólidos carece de marcadores eficientes para la identificación de pacientes susceptibles de recibir este tipo de tratamientos. Asumiendo que los pacientes con cáncer gástrico presentan un infiltrado de células CD8 y PD1 en sus tumores, estudiamos estas poblaciones linfocitarias en pacientes. Se realizó el fenotipado de poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo en sangre periférica y tejido (CD45, CD3, CD8, CD4, PD1, CD69, CD25), y se correlacionaron estos resultados con los obtenidos mediante técnicas de inmunohistoquímica en los mismos pacientes (CD8, PD1 y PDL1).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Polimorfismos del gen *TGFB1* y cáncer gástrico

Tras determinar que las poblaciones estudiadas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, pasamos a comparar la frecuencia de los distintos polimorfismos de base única del gen *TGFB1* en controles y pacientes. Encontramos un aumento en la frecuencia del genotipo rs1800471-G/C en el grupo de pacientes con respecto a los controles sanos. Esta variante se ha relacionado con una reducción en la expresión de la citoquina en otras patologías. En cuanto al resto de variantes, si bien no encontramos diferencias en la distribución de las variantes entre controles y pacientes, sí encontramos un aumento significativo de las variantes rs1800468-G/A, rs1800469-C/C y el haplotipo rs1800468-

A/rs1800469-C/rs1800470-T/rs1800471/G en pacientes con enfermedad diseminada (estadio IV). Estas variantes están relacionadas con una elevada expresión de la citoquina TGF- $\beta$ 1.

Tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes encontramos que los que presentaban las variantes rs1800468-C/C y C/T y rs1800470-T/T producían menos niveles de TGF- $\beta$ 1 que los portadores de sus respectivas variantes genotípicas (T/T y C/C). Resultados similares se encontraron en los pacientes homocigotos para el haplotipo rs1800469-C/rs1800470-T con respecto a pacientes homocigotos para rs1800469-T/rs1800470-C.

Con los datos obtenidos de las frecuencias genotípicas y haplotípicas, así como su efecto en la producción de TGF- $\beta$ 1, tomamos las variantes rs1800469-C y rs1800470-T, así como el haplotipo combinado rs1800469-C/rs1800470-T como marcadores de riesgo.

Al analizar las curvas de supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico, determinamos que los portadores de los genotipos o el haplotipo de riesgo, en homocigosis o heterocigosis, presentaban una menor supervivencia a 5 años que los pacientes con las variantes alternativas.

En conjunto, estos datos parecen indicar que las variantes que implican una expresión reducida de TGF- $\beta$ 1 identifican pacientes con cáncer gástrico con peor pronóstico.

Tras esto, decidimos estudiar los niveles de TGF- $\beta$ 1 como posible marcador de supervivencia (independiente de las variantes polimórficas del gen *TGFB1*) de pacientes con cáncer gástrico. Encontramos una menor expresión



de TGF- $\beta$ 1 en plasma de pacientes con una supervivencia menor a 5 años, así como una menor supervivencia de pacientes con valores de TGF- $\beta$ 1 en plasma menores a 40ng/mL. Si bien estos datos son preliminares y cuentan con un número reducido de muestras, los resultados están en la misma línea que los obtenidos en el análisis de polimorfismos relacionados con la expresión de TGF- $\beta$ 1.

Los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que una baja expresión de TGF- $\beta$ 1 condiciona un peor pronóstico y una menor supervivencia de pacientes con cáncer gástrico. Si bien el efecto de esta citoquina abarca procesos muy diversos en el organismo, una de las posibles explicaciones es la capacidad de esta citoquina de actuar como un supresor de tumores, por lo que una expresión reducida de esta molécula permitiría la progresión de la enfermedad a fases más avanzadas. Esto ya se ha demostrado en otros tipos de tumores. A modo de ejemplo, defectos en la señalización mediada por esta vía contribuyen al desarrollo y la progresión del cáncer de colon.

- Amplificaciones de HER2 en cáncer gástrico

Determinamos la presencia de amplificaciones genéticas de HER2 mediante técnicas de biología molecular en muestras de ADN procedentes de tejido tumoral o distal de pacientes con cáncer gástrico. Para identificar pacientes HER2+, elaboramos un punto de corte de la ratio HER2/*IFNG* basado en la media y la desviación estándar de esta ratio en muestras procedentes de 30 donantes sanos, que permitía determinar aquellos pacientes que sobrepasaban un umbral. Tanto la PCR diferencial (dPCR) como la PCR cuantitativa (qPCR) identificaron la

presencia de amplificaciones somáticas de HER2 en el 25% de los pacientes en ADN procedente de tejido tumoral, y nunca en el tejido distal de esos mismos pacientes.

Detectamos mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la presencia de HER2 en el tejido tumoral (y no en el distal) de los pacientes previamente identificados como HER2+ mediante dPCR y qPCR. Con esto, podemos afirmar que las técnicas de biología molecular antes indicadas son capaces de identificar pacientes con amplificaciones de HER2.

- Infiltrados de células CD8, PD1 y expresión de PDL1 en cáncer gástrico

Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica y tejido (tumoral y distal) de pacientes con adenocarcinoma gástrico y se analizaron por citometría de flujo. Se determinó mediante inmunohistoquímica la presencia de células CD8+, PD1+ y PDL1 en tejido.

Encontramos un aumento significativo de células PD1+ en linfocitos de sangre periférica de los pacientes con respecto a controles, siendo este incremento mayor en las células CD8+ de los pacientes comparado con los controles. Con respecto a las células CD8, encontramos una reducción en la ratio  $CD8_{high}/CD8_{low}$  en pacientes con cáncer gástrico comparado con los controles, lo que puede entenderse como incremento de  $CD8_{low}$  en detrimento de las células  $CD8_{high}$  en los pacientes. Algunos estudios han determinado que las células  $CD8_{low}$  tienen mayor capacidad citotóxica que los linfocitos  $CD8_{high}$ .

El cultivo de explantes de tejido permitió obtener células procedentes de tejido tumoral y distal de estos pacientes. La cantidad de células CD8 obtenidas del cultivo de tejido tumoral fue significativamente menor que las obtenidas del

tejido distal. Este hecho podría deberse a un proceso de anergia de las células CD8 en el microambiente tumoral de estos pacientes.

En tinciones inmunohistoquímicas, confirmamos un aumento de células CD8+ y PD1+ en tejido tumoral comparado con el tejido distal de estos pacientes, así como la expresión de PDL1 en parte de estos pacientes.

En función de la expresión de PDL1, encontramos un aumento de células CD8 y PD1 infiltrantes en el tumor de pacientes PDL1+ con respecto a pacientes PDL1- lo que indica que, si bien los pacientes PDL1+ tienen un mayor infiltrado, éste puede no ser efectivo en la eliminación de los tumores.

Adicionalmente, se halló la presencia de estructuras linfoides terciarias (TLS) presentes en los tejidos tumoral y distal de pacientes con cáncer gástrico. Identificamos estas estructuras por la presencia de células CD19+, CD8+ y PD1+. Si bien estas estructuras se encontraban en tejido tumoral y distal, encontramos un aumento de células CD8+ en el interior de estas estructuras en el tejido distal de estos pacientes, lo que podría indicar una mayor activación de las células CD8+ en el tejido tumoral.

## **CONCLUSIONES**

- Los polimorfismos del gen *TGFB1* y la expresión de TGF- $\beta$ 1 podrían emplearse como marcadores pronósticos en pacientes con adenocarcinoma gástrico

- Las técnicas basadas en biología molecular pueden ser una buena herramienta complementaria para la identificación de amplificaciones de HER2 en pacientes con cáncer gástrico
- Los pacientes con cáncer gástrico presentan una alta infiltración de células CD8+ y PD1+, así como estructuras linfoides terciarias y, parte de ellos, una alta expresión de PDL1. La determinación en sangre y tejido de los marcadores aquí estudiados podría servir como método para identificar pacientes susceptibles de beneficiarse de las terapias anti PD1/PDL1.

# SUMMARY

---

## INTRODUCTION

Cancer is a multifactorial disease with a series of defining characteristics, including: maintenance of proliferation signals, evasion of proliferation suppressors, resistance to cell death, replicative immortality, induction of angiogenesis, evasion and metastasis, genomic instability and mutation, pro-tumor inflammation, reprogramming of energy metabolism and evasion of anti-tumor immune response.

As part of this last characteristic, it is important to highlight the involvement of the immune system in the anti-tumour response, following a process called immunoediting, which consists of three phases: elimination of the tumor by the immune system, balance between the immune response and the tumor suppressor mechanisms and, finally, escape from the tumor and invasion of adjacent and distal tissues.

Gastric cancer is the fifth most common type of tumor in the world's population, with over one million deaths worldwide each year. It is one of the tumors with the highest prevalence of somatic mutations, which facilitates the formation of tumor neo-antigens and makes these tumors susceptible to treatment with various types of immunotherapy.

Immunotherapy is a series of treatments based on the prevention or treatment of a disease that promotes the stimulation of the immune system. In this line, there are a number of treatments based on immunotherapy against cancer that aim to block pro-tumor signaling pathways as well as the stimulation (direct or secondary) of the immune response against tumors. In the specific case

of gastric cancer, treatment with HER2-blocking antibodies (trastuzumab) is used in HER+ patients, while immune system checkpoint inhibitors are only approved for the treatment of patients in very advanced stages of the disease, with disseminated disease, and refractory to chemo and radiotherapy. The difficulty for the treatment of these patients lies in the correct determination of biomarkers that identify patients susceptible to receive immunotherapy.

## **HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**

Due to the need to obtain prognostic and predictive markers for the use of immunotherapy in patients with gastric cancer, this work aims to study markers related to the immune system and immunotherapy in gastric cancer. We worked in three lines of research:

- Polymorphisms of the *TGFB1* gene and gastric cancer: Assuming that the variants of the *TGFB1* gene that relate to TGF- $\beta$ 1 levels, could affect the development and evolution of gastric tumors, we studied the frequency of distribution of four single nucleotide polymorphisms (rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471) in patients, according to their tumor type and survival. In addition, we determined the presence of the cytokine TGF- $\beta$ 1 in the plasma of patients and its relation with on the survival rates.

- HER2 amplifications in gastric cancer: Patients with gastric cancer may present amplifications of the HER2 gene in their primary tumors, although the techniques to detect these amplifications and HER2 expression render false positive and negative results with high frequency.

Therefore, we wanted to determine the ability of molecular biology techniques using DNA from samples from gastric cancer patients to detect HER2 amplifications.

- CD8, PD1 infiltrates and PDL1 expression in gastric cancer. Immunotherapy directed against PD1 in solid tumors lacks efficient markers for the identification of patients susceptible to this type of treatment. Since gastric cancer patients have a high CD8 and PD1 cell infiltration in their tumors, we phenotyped lymphocyte populations by flow cytometry in peripheral blood and tissue of these patients (CD45, CD3, CD8, CD4, PD1, CD69, CD25), as well as the correlation of these results with immunohistochemical techniques in the same patients (CD8, PD1 and PDL1).

## RESULTS AND DISCUSSION

- *TGFB1* gene polymorphisms and gastric cancer

After determining that the populations studied were in Hardy-Weinberg equilibrium, we went on to compare the frequency of the different single nucleotide polymorphisms of the *TGFB1* gene in controls and patients with gastric cancer. We found an increase in the frequency of the rs1800471-G/C genotype in the group of patients with respect to healthy controls. This variant has been associated with a reduction in the cytokine expression in other pathologies. As for the other variants, although no different in their distribution between controls and patients, we did find a significant increase of the variants rs1800468-G/A, rs1800469-C/C and the haplotype rs1800468-A/rs1800469-C/rs1800470-T/rs1800471-G in patients with disseminated disease (stage IV). All of them associated with high expression of the cytokine TGF- $\beta$ 1.



After stimulation of peripheral blood mononuclear cells from patients with gastric cancer, we determined that patients bearing the variants rs1800468-C/C and C/T and rs1800470-T/T produced lower levels of TGF- $\beta$ 1 than patients bearing their respective genotypic variants (T/T and C/C). Similar results were observed comparing patients homozygous for the haplotype rs1800469-C/rs1800470-T with patients homozygous for rs1800469-T/rs1800470-C.

With the data obtained from the genotypic and haplotypic frequencies, as well as their effect on the production of TGF- $\beta$ 1, we take the variants rs1800469-C and rs1800470-T, and the combined haplotype rs1800469-C/rs1800470-T, as risk markers.

Upon analysis of the survival curves of patients with gastric cancer, we determined that patients with the risk genotypes or haplotype, in homozygosis or heterozygosis, had a shorter 5-year survival than patients with the alternative variants.

Taken together, these data indicate that the variants involving reduced expression of TGF- $\beta$ 1 identify patients with gastric cancer with a worse prognosis.

After this, we decided to study the levels of TGF- $\beta$ 1 as a possible survival marker (independent of the polymorphic variants of the *TGFB1* gene) of patients with gastric cancer. We found a lower expression of TGF- $\beta$ 1 in plasma of patients with a survival of less than 5 years, as well as a lower survival of patients with plasma TGF- $\beta$ 1 values lower than 40ng/mL. Although these data are preliminary and have a reduced number of

samples, the results are in line with those obtained in the analysis of polymorphisms related to the expression of TGF- $\beta$ 1.

The results obtained in this study indicate that a low expression of TGF- $\beta$ 1 is linked to a worse prognosis and lower survival of these patients. Although the effect of this cytokine covers very diverse processes in the body, one of the possible explanations is the capacity of this cytokine to act as a tumor suppressor: a reduced expression of this molecule would allow the progression of the disease to more advanced stages. This has already been demonstrated in other types of tumors. As an example, signaling defects in this pathway contribute to the development and progression of colon cancer.

#### - HER2 amplification in gastric cancer

We determine the presence of genetic amplifications of HER2 by molecular biology techniques in DNA samples from tumor or distal tissue of gastric cancer patients. To identify HER2+ patients, we developed a cut-off point for the HER2/*IFNG* ratio that allowed us to pinpoint patients that exceeded a threshold achieved using samples from 30 healthy donors, based on the mean and standard deviation of this ratio. Both differential PCR (dPCR) and quantitative PCR (qPCR) identified the presence of somatic HER2 amplifications in 25% of patients in DNA from tumoral tissue, but not distal tissue paired samples.

We determined by immunohistochemistry and immunofluorescence the presence of HER2 in the tumor tissue (and not distal) of the patients previously identified as HER2+ by dPCR and qPCR. Thus, we can state that molecular biology-based techniques in DNA samples from tumor tissue are able to identify patients with HER2 amplifications.

- CD8, PD1 infiltrates and PDL1 expression in gastric cancer

Peripheral blood and tissue lymphocytes (tumoral and distal) were obtained from patients with gastric adenocarcinoma and analyzed by flow cytometry. The presence of CD8, PD1 and PDL1 cells in tissue was assessed by immunohistochemistry.

A significant increase of PD1+ cells in peripheral blood lymphocytes of patients compared to controls was found, being this increase higher in CD8+ cells of patients compared to controls. Regarding CD8 cells, we found a reduction in the CD8<sub>high</sub>/CD8<sub>low</sub> ratio in patients with gastric cancer compared to controls, probably due to an increase in the CD8<sub>low</sub> population to the detriment of CD8<sub>high</sub> cells. Some studies assessed that CD8<sub>low</sub> cells have greater cytotoxic capacity than CD8<sub>high</sub> lymphocytes.

The culture of tissue explants allowed us to obtain cells from tumoral and distal tissue of these patients. The amount of CD8+ cells obtained from the tumor tissue culture was significantly lower than those obtained from the distal tissue. This fact could be due to an anergy process of the CD8+ cells in the tumor microenvironment.

Using immunohistochemical staining of histological sections, we found an increase in CD8+ and PD1+ cells in tumor tissue compared to distal tissue of these patients, as well as the expression of PDL1 in some of these patients.

Based on PDL1 expression, an increase in the numbers of CD8+ and PD1+ infiltrating cells in the tumor of PDL1+ compared to PDL1-

patients, indicating that, while PDL1+ patients have increased cell infiltration, it may not be effective at eliminating the tumors.

Additionally, the presence of tertiary lymphoid structures (TLS) was found in the tumor and distal tissues of gastric cancer patients. We identified these structures by the presence of CD19+, CD8+ and PD1+ cells. Although these structures were found in tumor and distal tissue, we found an increase of CD8+ cells inside these structures in the distal tissue of these patients, which could indicate an augmented activation of CD8 cells in the tumoral tissue of the patients.

## **CONCLUSIONS**

- *TGFB1* gene polymorphisms and TGF- $\beta$ 1 expression could be used as prognostic markers in patients with gastric adenocarcinoma.

- Molecular biology-based techniques may be a good complementary tool to identify HER2 amplifications in patients with gastric cancer.

- Patients with gastric cancer have a high infiltrate of CD8+ and PD1+ cells, as well as tertiary lymphoid structures and, some of them, a high tissue expression of PDL1. The determination of the markers studied here in blood and tissue could serve as a method to identify patients susceptible to benefit from anti-PD1/PDL1 therapies.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de patologías en las que células propias del organismo sufren procesos de transformación maligna que provocan su división celular de forma incontrolada (1). Estas células tienen una alta capacidad de proliferación y no responden a los sistemas de control, tanto intrínsecos como extrínsecos, del organismo, y terminan por formar grandes estructuras celulares denominadas tumores (2). El paso de una célula sana a una célula maligna es debido a la presencia (en el caso de tumores hereditarios) o adquisición somática de mutaciones transformantes que afectan a determinados tipos de genes, catalogados como proto-oncogenes, capaces de promover la transformación maligna a causa de un incremento en los niveles o actividad de la proteína, a raíz de diversas mutaciones (3), o genes supresores de tumores, que controlan los mecanismos de proliferación celular y supervivencia (4).

Aunque un pequeño grupo de tumores son hereditarios (como el retinoblastoma familiar, la neurofibromatosis de tipo 1, el síndrome de Li-Fraumeni), la mayoría de cánceres (aproximadamente, el 80%) son de origen esporádico (5), debidos a mutaciones *de novo* en células somáticas del organismo. Si bien existe una alta variabilidad entre cada tipo tumoral, está establecido que se requieren dos eventos mutacionales que afecten al mismo gen, provocando su inactivación completa, en el caso de genes supresores de tumores, o una ganancia de función constitutiva, en el caso de los proto-oncogenes. Estas dos mutaciones pueden tener origen y haberse producido por mecanismos distintos, siendo frecuente una primera mutación puntual, que altere uno de los alelos del gen, seguida de una mutación que implique la pérdida de heterocigosidad (pérdidas de fragmentos cromosómicos, deleciones completas del gen, etc.) (6), quedando como única copia el alelo mutado con anterioridad. Estas mutaciones se denominan “conductoras”, que confieren una ventaja selectiva para el crecimiento del tumor. También existen las mutaciones “pasajeras”, mutaciones secundarias que no confieren al tumor ninguna característica que beneficie a su desarrollo del tumor, pero que provocan la formación de neo-antígenos tumorales (7).

## **2. Características del cáncer**

Dentro de los genes alterados durante el proceso de transformación maligna de las células tumorales, existen seis características principales que engloban los mecanismos en los que estos genes se ven implicados durante el proceso de tumorigénesis (8). En la figura 1 se resumen en forma de esquema las distintas características explicadas en este apartado (Ver figura 1):

### **2.1. Mantenimiento de señales de proliferación**

Para mantener la homeostasis en los tejidos, las señales de crecimiento que conducen a las células a la división celular están estrechamente reguladas, manteniendo de esta manera la arquitectura y función normal de los tejidos. Los mecanismos por los cuales se pueden producir este tipo de alteraciones son muy variados: exceso de producción de factores autocrinos, desregulación de receptores y señales intracelulares (mutaciones en *ras* o B-raf) o el desarrollo de señalización constitutiva independiente de factores de crecimiento (mutaciones en EGFR), entre otros.

### **2.2. Evasión de supresores de la proliferación**

De manera inversa a las señales que inducen proliferación, uno de los mecanismos de control son las proteínas que provocan supresión de los mecanismos de proliferación de las células. Los genes supresores del crecimiento, o supresores de tumores, están bien caracterizados en modelos animales de ganancia y pérdida de función. Dos de los principales genes supresores de tumores son las proteínas de la familia RB (asociadas a retinoblastoma: pRB, p107 y p130), que controla la entrada al ciclo celular (9), y de la familia p53 (p53, p63 y p73) que dirige las células a apoptosis en caso de daño celular irreparable (10). La alteración de proteínas pertenecientes a estas familias, especialmente en forma de mutaciones secundarias, propicia el paso de tumores benignos a tumores malignos, como ocurre en el caso del cáncer colorrectal (11).

Existen otras vías de señalización con propiedades anti-proliferativas, y cuya disfunción es debida a mutaciones somáticas, que no solo les hace perder su actividad supresora, si no que les confiere capacidad de activar mecanismos relacionados con la transición epitelio-mesénquima y la metástasis, como es la vía TGF- $\beta$ 1/SMAD (12).

### **2.3. Resistencia a la muerte celular**

En línea con la familia p53, la resistencia de las células tumorales a los mecanismos de muerte celular altera la homeostasis de los tejidos, actuando como una barrera natural contra el cáncer (13, 14). Los factores que provocan apoptosis se organizan desde la superficie celular (Fas/FasL) hasta el interior celular (vía de las caspasas, Bcl-2/xL), incluso en el interior de las mitocondrias (citocromo C). Las rutas de muerte celular, tanto intrínsecas como extrínsecas, se organizan para provocar la muerte celular por apoptosis cuando, por ejemplo, el daño celular es irreparable (15). En el caso de los tumores, las células malignas presentan varias alteraciones genéticas que serían reconocidas como daño celular y, por tanto, las conduciría a apoptosis. Sin embargo, la alteración en proteínas de las familias previamente mencionadas permitiría a las células tumorales evadir los mecanismos de muerte celular.

### **2.4. Inmortalidad replicativa**

Las células cancerosas requieren de un elevado potencial de replicación para formar tumores sólidos de tamaño macroscópico. Al contrario que el resto de las células del organismo, no presentan ninguna limitación en el número de ciclos de división que pueden realizar, evitando las dos principales barreras replicativas: la muerte celular programada (mecanismo previamente descrito) y la entrada en senescencia, mediante la cual una célula entra en un estado estacionario de forma indefinida, perdiendo su capacidad replicativa. Cuando una célula es capaz de revertir el estado de senescencia, se denomina inmortalización. El mecanismo de inmortalidad replicativa está principalmente mediado por los telómeros y la enzima telomerasa, una polimerasa de ADN especializada en regenerar los telómeros en los extremos cromosómicos (16). En la mayoría de las células inmortalizadas (90%), incluyendo los tumores, la



telomerasa se expresa en niveles funcionalmente activos, lo que permite la elongación indeterminada de los telómeros y, por tanto, un potencial replicativo ilimitado (17).

## **2.5. Inducción de angiogénesis**

Debido al potencial replicativo ilimitado, los tumores tienen unos altos requerimientos energético (oxígeno y nutrientes) y requieren la eliminación de desechos tóxicos derivados de su elevado metabolismo. En tumores sólidos no vascularizados, se forman regiones de hipoxia (que activan HIF-1, entre otras moléculas) y necrosis (18). A causa de esto, las células circundantes secretan factores pro-angiogénicos, principalmente VEGF, lo que permite al tumor generar su propia vasculatura (19), fenómeno conocido como angiogénesis, cuando los vasos se generan a partir de la elongación de vasos sanguíneos ya existentes, o vasculogénesis, cuando la formación de vasos sanguíneos no recurre a vasos preexistentes (20).

## **2.6. Invasión y metástasis**

Las células malignas (especialmente, carcinomas epiteliales), además de formar un tumor sólido, pueden perder moléculas de adhesión como E-cadherina, activando mecanismos de motilidad. Este hecho, junto con la expresión de moléculas de adhesión típicas de células migratorias (como N-cadherina, presente en neuronas migratorias y carcinomas invasivos), permite a estas células salir de su entorno, movilizarse e implantarse en otros tejidos, dando lugar a metástasis. Uno de los procesos principales para que suceda esta diseminación tumoral es la transición epitelio-mesénquima, por la cual células de origen epitelial sufren cambios promovidos por ciertos factores de transcripción (Snail, Slug, Twist-1 y ZEB1/2). Estos cambios implican la pérdida de la polaridad celular y las uniones de adhesión, y la adopción de un fenotipo mesenquimal con capacidad migratoria (21).

Además de estos factores intrínsecos a las células tumorales, actualmente se consideran una serie de características emergentes y capacitantes, externas al tumor, que modifican tanto la aparición como la progresión de los tumores (13, 14).

Dentro de las características habilitantes, podemos encontrar:

## **2.7. Inestabilidad genómica y mutación**

Las características previamente mencionadas requieren de una situación previa en las células pre-malignas, que es la adquisición de mutaciones que alteren los distintos genes relacionados con proliferación, muerte celular, control de motilidad, etc. Por tanto, la inestabilidad genómica es uno de los factores condicionantes de la adquisición de nuevas características en las células tumorales. La inestabilidad genómica se puede clasificar en dos grandes grupos: Inestabilidad microsatélite (MSI, en sus siglas en inglés), condicionada por fallos en los sistemas de reparación del ADN, e inestabilidad cromosómica (CIN, en sus siglas en inglés), relacionada con una alta tasa de aberraciones cromosómicas (22). Esta elevada tasa de errores de reparación y anomalías cromosómicas no solo provoca que los tumores adquieran características malignas, sino que, además, favorece la aparición de neo-antígenos (23), potencialmente reconocibles por el sistema inmunitario y de gran importancia para la inmunoterapia en cáncer, como se detalla en próximos apartados.

## **2.8. Inflamación pro-tumoral**

En la mayoría de las lesiones neoplásicas pueden encontrarse distintos tipos de células inmunitarias infiltrantes, cubriendo un amplio rango de inflamación. Si bien estas reacciones inflamatorias están descritas como un mecanismo de eliminación tumoral a través del sistema inmunitario, estos mismos infiltrados tienen la capacidad de potenciar características típicas de los tumores, como el crecimiento, la movilidad y angiogénesis, a través de factores de crecimiento (EGF, HGF), moléculas quimiotácticas y angiogénicas (IL-6, TNF- $\alpha$  y VEGF), así como mantener un ambiente oxidativo que causa daño en el ADN (24). Este tipo de respuestas ocurren cuando la inflamación se vuelve una

condición crónica, en la que los linfocitos T comienzan a expresar receptores inhibidores, como PD1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3, entrando en un estado de anergia al unirse a sus ligandos (PDL1, CD80/86, Gal-9/PtdSer/HMGB1 y LSECtin/FGL1/MHC-II, respectivamente), presentes en el microambiente tumoral (25-27), al mismo tiempo que otras células inmunitarias se mantienen activas.

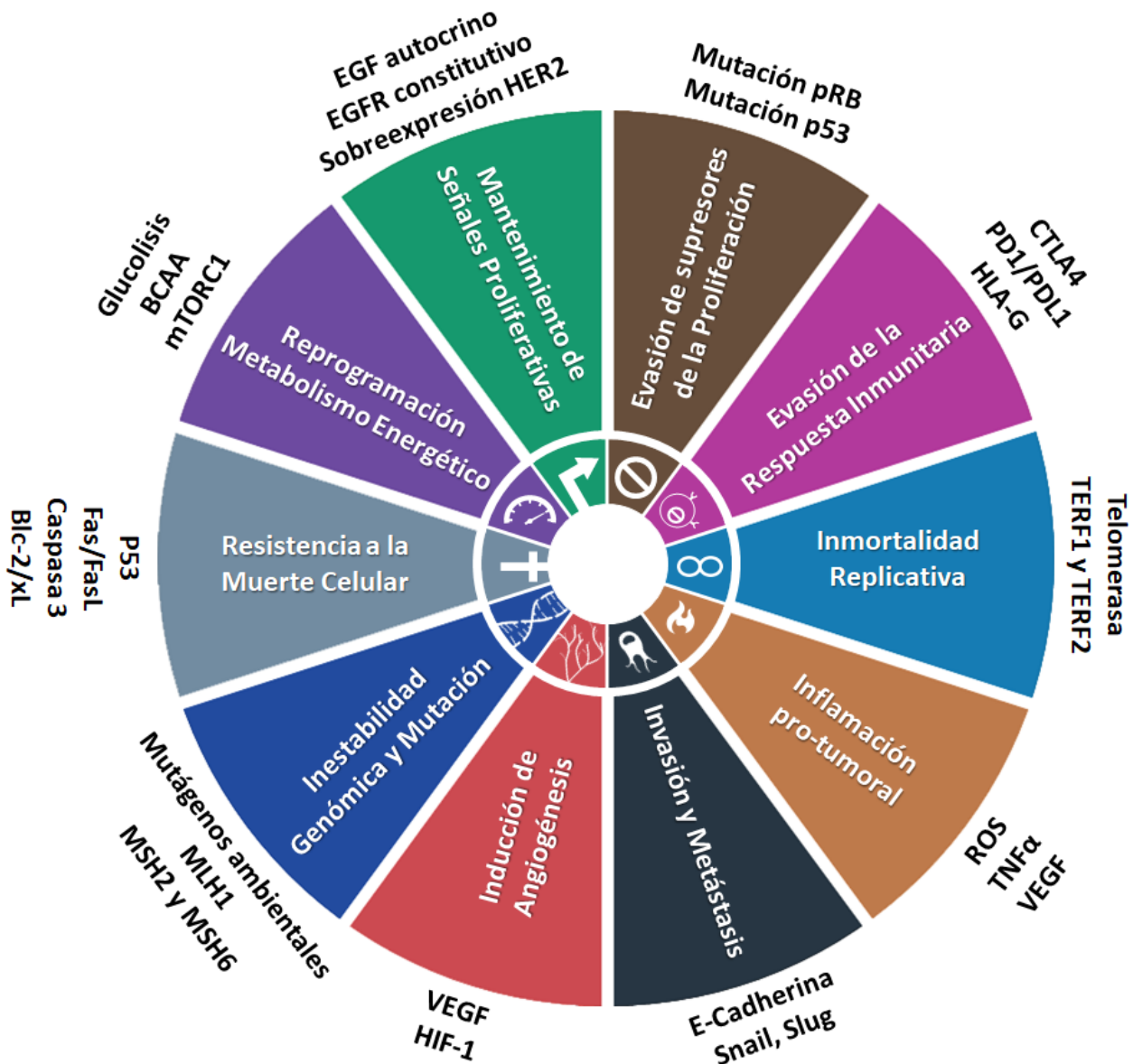
## **2.9. Reprogramación del metabolismo energético**

Debido a los altos requerimientos energéticos y la alta competencia generada por los tumores, las células tumorales sufren una serie de transformaciones a nivel metabólico, que ajustan el consumo energético para alimentar los procesos de crecimiento y división celular (28). Si bien las mutaciones que afectan a enzimas metabólicas son poco frecuentes (29, 30), existen otras adaptaciones metabólicas debidas a la carencia de irrigación y, por tanto, oxígeno y nutrientes. Estos mecanismos de adaptación incluyen la activación del proceso de autofagia, oxidación de ácidos grasos y metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs, en inglés), todos ellos propiciados principalmente por la alteración de la señalización controlada por mTORC1 (31). La alteración de las vías metabólicas en el cáncer no solo permite a los tumores proliferar en situaciones de anaerobiosis, si no que propicia un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, en sus siglas en inglés), provocando un incremento del daño celular (mutaciones en el ADN, peroxidación lipídica y modificación de enzimas), así como un ambiente pro-inflamatorio (32).

## **2.10. Evasión de la respuesta inmunitaria**

Si bien aún existe controversia con respecto a este punto, la hipótesis de la inmunoedición propone que el sistema inmunitario es capaz de monitorizar el estado de las células en los tejidos, identificando aquellas que han sufrido modificaciones malignas, eliminándolas y, por tanto, controlando la formación de tumores (33). Este mecanismo, sin embargo, se vería alterado en el proceso tumoral, donde fallos en los

sistemas de control intrínsecos del tumor (previamente mencionados) propiciarían la aparición del tumor, y modificaciones secundarias inhibición de la inhibición de la respuesta inmunitaria contra el tumor y, finalmente, el escape del tumor y su invasión de tejidos próximos y distales (metástasis). La respuesta inmunitaria anti-tumoral y la evasión de la misma por parte de las células tumorales se detallarán en los siguientes apartados.



**Figura 1.** Características del cáncer. La figura describe las características representativas del cáncer, así como distintas moléculas implicadas en cada característica. (Modificada de Hanahan & Weinberg, *Cell*, 2011)

### 3. Inmunoedición

El proceso mediante el cual el sistema inmunitario sería capaz de eliminar las células malignas y el posible escape del tumoral a la respuesta inmunitaria sucedería en tres fases: Eliminación, equilibrio y escape. En la figura 2 se resumen las distintas fases del proceso de inmunoedición (ver figura 2).

#### 3.1. Eliminación

Es el mecanismo más cercano al fenómeno de inmunovigilancia propuesto por Burnet y Thomas (34, 35). En esta fase, la organización del sistema inmunitario innato y adaptativo tienen como resultado la identificación de las células malignas y su consiguiente eliminación. En primer lugar, las células malignas comienzan su crecimiento como tumor primario, provocando daño endotelial y creciendo hasta un tamaño de entre dos y tres milímetros, en el que comienzan a suceder los procesos de hipoxia y necrosis previamente mencionados. Con esto, se activan los procesos de modificación de la matriz extracelular y metástasis, lo que promueve la activación de fenómenos inflamatorios del sistema inmunitario innato, mediados por células NK, NKT, linfocitos T  $\gamma\delta$ , macrófagos y células dendríticas. La respuesta innata comenzaría la eliminación de las células tumorales, empleando vías de señalización y muerte mediadas por la familia de IL-12, Fas-FasL, TRAIL y perforinas (36).

Esta primera fase se organiza a través de la liberación de IFN $\gamma$  por las células del sistema inmunitario, un mediador central de la respuesta antitumoral. Con esto se activa las respuestas innatas y adaptativas a través de su receptor heterotetramérico (formado por dos *IFNGR1* y dos *IFNGR2*) y la vía de señalización JAK-STAT (JAK1/2 y STAT1), activando las células presentadoras de antígeno (APC), promoviendo expresión de moléculas HLA (-DR y -ABC) y la presentación de antígenos tumorales.

Tras esta primera eliminación, el contenido intracelular de las células tumorales es liberado al medio extracelular, lo que permite a las células dendríticas capturarlos. Tras la captura de antígenos, las APC maduran, migran a los nódulos linfáticos y presentan los antígenos captados a los linfocitos T CD8 y CD4, dando como resultado la generación de linfocitos T CD8 citotóxicos (CTL, en inglés) específicos de tumor. Los CTL activados migran entonces al microambiente tumoral, y eliminan a las células tumorales, tras reconocer los antígenos específicos en la superficie de las células malignas y las eliminan a través de la señalización mediada moléculas de histocompatibilidad clase I, perforinas y Fas-FasL (37, 38).

La eliminación de células tumorales por acción del sistema inmunitario vuelve a liberar antígenos tumorales, reiniciando el ciclo cáncer-sistema inmunitario, por el cual la liberación de neo-antígenos promueve la eliminación de más células tumorales, propiciando de nuevo la liberación y captación de proteínas de origen tumoral (39).

Si el sistema inmunitario es capaz de eliminar el tumor por completo, el proceso de inmunoección culmina y se reestablece el tejido a su situación normal. Sin embargo, los tumores pueden adquirir mecanismos para evitar su eliminación por el sistema inmunitario, por lo que se llegaría a la fase de equilibrio, en la que el sistema inmunitario y el tumor competirían: el primero, para continuar eliminando las células malignas, mientras el tumor desarrolla mecanismos supresores del sistema inmunitario.

### **3.2. Equilibrio**

En esta fase, se mantiene el ambiente pro-inflamatorio y se producen los mecanismos de eliminación de células malignas descritas en el apartado anterior. Sin embargo, este ambiente pro-inflamatorio, junto con los mecanismos de transformación maligna intrínsecos a las células tumorales (ver apartado Características del cáncer y figura 1), propicia la aparición de mecanismos de resistencia a la eliminación del sistema inmunitario. Entre estos sistemas de defensa, destacan la pérdida de antígenos tumorales por mutación (40), desaparición de moléculas de HLA de clase I (41), mecanismos de “muda” o

“descamación” de ligandos que inducen apoptosis en las células tumorales, como son los ligandos de NKG2D (MICA y MICB) (42), insensibilidad a IFN $\gamma$  (43) y a la muerte celular inducida. Los mecanismos desarrollados por el tumor competirían entonces con el efecto supresor de tumores del sistema inmunitario, llegando a una situación de equilibrio entre el tumor y la respuesta inmunitaria.

Los tumores son entidades complejas, en las que, a raíz de la alta tasa de mutación que sufren las células que conforman el tumor, se forman grupos heterogéneos de células, cada una con adaptaciones distintas a los mecanismos de control, tanto intrínsecos como relacionados con el sistema inmunitario. Por tanto, durante largos periodos de equilibrio, se suceden distintos procesos de eliminación de células tumorales, peor adaptadas a la respuesta citotóxica, mientras que se mantienen aquellas que son capaces de resistir el proceso de eliminación. Con esto, se produce un proceso de “tallado, o selección, del tumor, mediante el cual las células no resistentes son eliminadas y las que resisten la acción del sistema inmunitario progresan, lo que desencadena la formación de tumores poco inmunogénicos, con peor pronóstico (44).

La fase de equilibrio es la más larga de las tres fases que comprenden el proceso de inmunoelección. Esto se debe a que el tumor sufre procesos continuos de proliferación y destrucción, que puede llegar a durar varios años.

Los tumores que sobrepasan la fase de equilibrio y consiguen evadir por completo la respuesta inmunitaria progresan, y son capaces de invadir tejidos próximos y migrar a largas distancias, provocando metástasis, entrando en lo que se denomina la fase de escape.

### **3.3. Escape**

Tras la fase de equilibrio, la selección producida en los tumores heterogéneos ha permitido el desarrollo de tumores con un fenotipo poco

inmunogénico, insensibles a la acción del sistema inmunitario. Estos tumores proliferan, secretan factores inmunosupresores y pro-angiogénicos, y sufren procesos de EMT y metástasis.

Los mecanismos que ejercen este tipo de tumores para evadir la respuesta inmunitaria, como sucedía en la fase de equilibrio, consisten la pérdida definitiva de antígenos tumorales y en la inhibición de los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL, en sus siglas en inglés), que pierden la expresión de la cadena CD3 $\zeta$  (45, 46). La ausencia de la cadena CD3 $\zeta$  conduce a una disminución en la producción de IFN $\gamma$  y un aumento en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10 y TGF- $\beta$ , promoviéndose la diferenciación de los linfocitos T a células T reguladoras, lo que causa la inhibición de la respuesta inmunitaria. En el tumor también se secretan factores solubles de carácter inmunosupresor, como las moléculas solubles previamente mencionadas (sMICA/B, IL-10 y TGF- $\beta$ ), así como factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y prostaglandina E 2 (PGE2) (47).

Como resultado de la eliminación parcial de las células tumorales inmunogénicas, y la consiguiente selección de aquellas capaces de resistir la respuesta inmunitaria, se forma un tumor de carácter poco inmunogénico, que ha adquirido las características previamente mencionadas que le permitirán crecer y proliferar sin control, migrar a tejidos próximos y realizar metástasis a largas distancias. Estas células serán capaces de injertarse en sus tejidos diana variables, en función del tropismo del tumor (48).

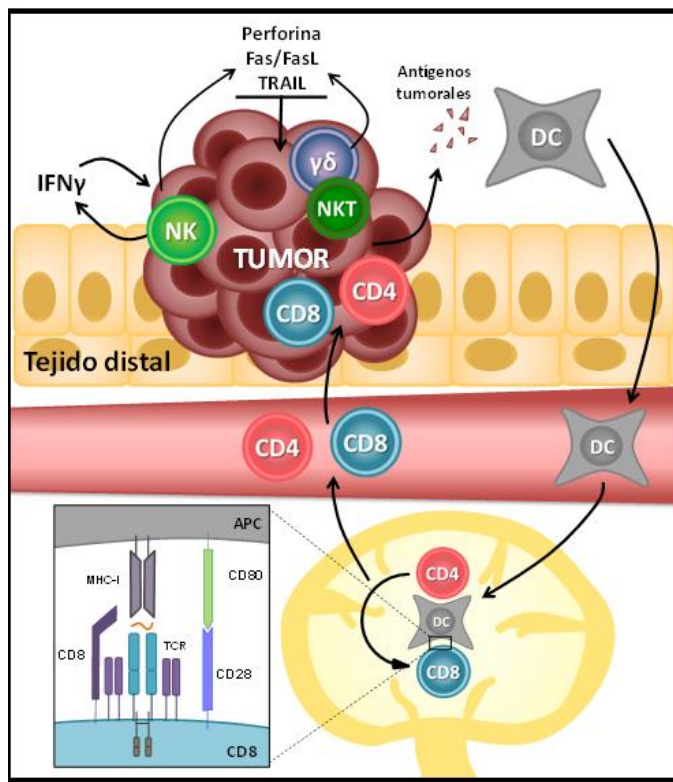


Si bien este proceso de inmunoeedición representaría un mecanismo común a diversos tipos tumorales, ciertos tumores quedarían exentos de las primeras fases del proceso, debido a una localización tisular inmunoprivilegiada, la ausencia de neoantígenos tumorales o a microambientes inmunosupresores debidos a condiciones patológicas (por ejemplo, inmunosupresión farmacológica por trasplantes). Se denomina tumores fríos a aquellos tumores malignas que carecen de infiltrados linfocitarios (principalmente, células T) y que, por tanto, tendrán problemas en generar respuestas inmunitarias efectivas contra las células tumorales (49).

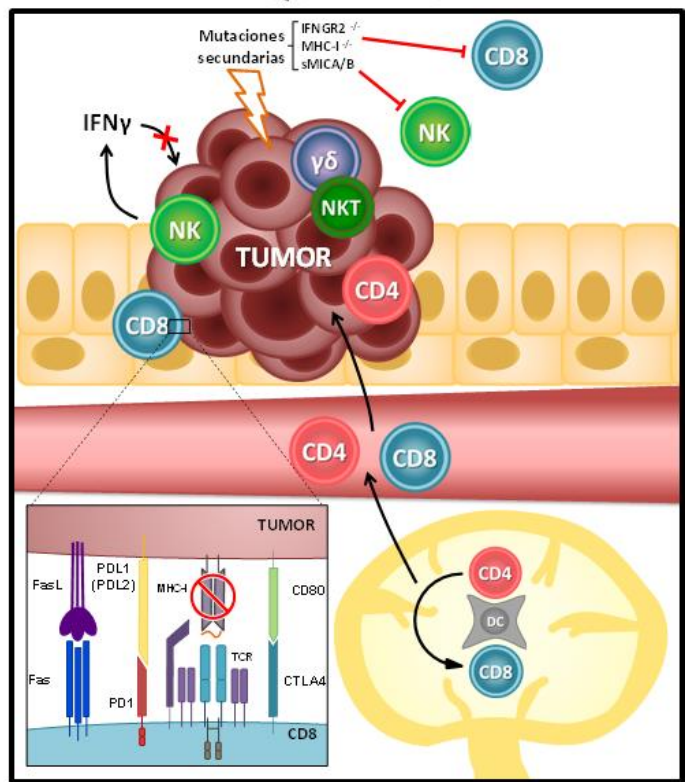
Algunos ejemplos de tumores fríos debidos a su localización tisular son el neuroblastoma, el cáncer de próstata y el cáncer de páncreas (50), normalmente carentes de infiltrados linfocitarios, con una baja tasa mutacional y no respondedores a terapias basadas en el bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario.

Por el contrario, los tejidos con un sistema inmunitario asociado desarrollado, como puede ser el sistema inmunitario de las mucosas, son susceptibles de generar respuestas inmunitarias efectivas contra las células tumorales, debido a que un estudio comparativo entre el tejido normal y el maligno pueden indicar el estado de activación inmunológica en el tumor. Los datos revelan que el microambiente de la CCR promueve la coexistencia de respuestas inmunes supresoras y proinflamatorias aparentemente antagónicas y podría proporcionar una explicación de por qué un bloqueo del eje PD1/PD-L1 es ineficaz en el cáncer colorrectal (51).

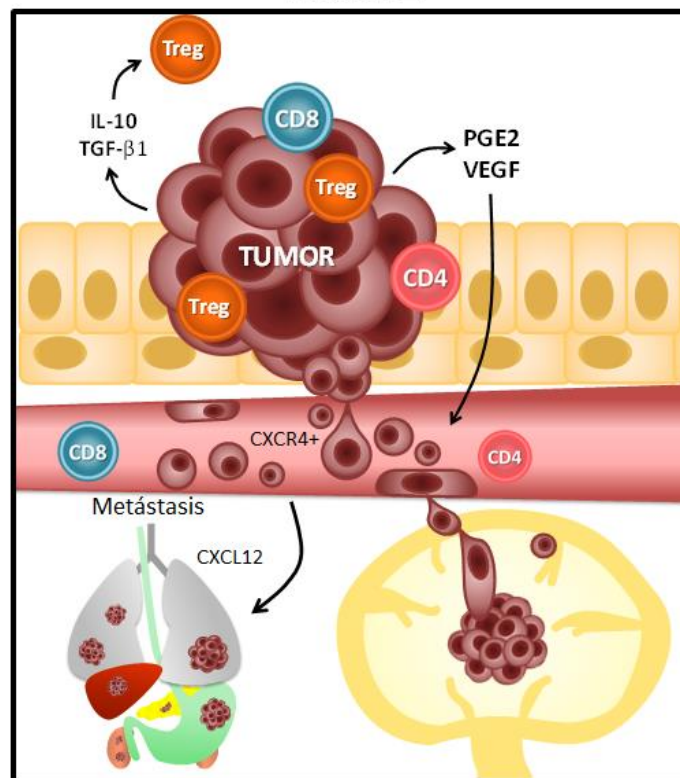
## ELIMINACIÓN



## EQUILIBRIO



## ESCAPE



**Figura 2.** Fases del proceso de Inmunoedición. CD4: Linfocito Th, CD8: Linfocito T T citotóxico, NK: Linfocito *Natural Killer*, NKT: Linfocito T *Natural Killer*,  $\gamma\delta$ : Linfocito T Linfocito T  $\gamma\delta$ , DC: Célula Dendrítica, Treg: Linfocito T regulador, sMICA/B: MICA/B solubles. (Modificada de Dunn et al. Annu. Rev. Immunol. 2004).

## 4. Evidencias del proceso de inmunoeedición

Si bien la hipótesis de la inmunoeedición no ha sido completamente demostrada, existen una serie de evidencias, tanto experimentales en de ratón como observacionales, basadas en ciertas patologías humanas relacionadas con el sistema inmunitario.

### 4.1. Evidencias experimentales de la inmunovigilancia en animales

Experimentos llevados a cabo en distintos modelos animales (principalmente en ratón) relacionados con la inhibición del sistema inmunitario:

- Ratones desnudos: Estos ratones (denominados nu/nu) carecen de timo, por lo que carecen por completo de linfocitos T en su etapa adulta. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la aparición de tumores espontáneos entre los ratones nu/nu y los ratones nu/+, este modelo se empleó en etapas muy tempranas de la investigación de la respuesta inmunitaria contra el cáncer, y no se tuvo en cuenta la presencia de otras células inmunitarias con orígenes distintos, como los linfocitos B y los linfocitos NK, que tienen un desarrollo embrionario independiente del timo (52). Debido al importante papel que desempeñan estos tipos celulares (y, en mayor medida, las células NK) en la eliminación de las células tumorales, se tomó este modelo como incompleto, por lo que se pasó a emplear otros modelos de ratones inmunodeficientes.
- Ratones mutantes de la vía de interferón de tipo 2 (IFN $\gamma$ , *IFNGR1*, STAT1). Mediante la eliminación de los mediadores principales de la vía de señalización de IFN $\gamma$  (*IFNGR1*<sup>-/-</sup>, STAT1<sup>-/-</sup>) o del propio gen de IFN $\gamma$  en ratones, se observó un aumento en la aparición de tumores mediada por metilcolantreno (MCA) (53, 54), un químico inductor de carcinogénesis. Ratones con mutaciones en la vía de IFN $\gamma$ , acompañadas de alteraciones en la proteína p53, desarrollaban tumores más tempranos y agresivos (55).

- Ratones con mutaciones en perforina. La molécula perforina es una proteína formadora de poros, contenida dentro de los gránulos citolíticos de los CTL y células NK. Estas moléculas median mecanismos de muerte de células diana, entre las cuales están las células tumorales reconocidas por el sistema inmunitario. Se describió que ratones carentes de esta molécula (*Prf1<sup>-/-</sup>*) eran más susceptibles al desarrollo de tumores espontáneos (56) y farmacológicos (tratados con MCA) (54).
- Ratones con mutaciones en RAG-1/2: Los genes RAG-1 y RAG-2 son los genes encargados del mecanismo de recombinación de inmunoglobulinas y la molécula del TCR (en linfocitos B y células T, respectivamente), por lo que mutaciones en estos genes provocan la completa ausencia de células NKT, T y B en el organismo. Se demostró que los ratones con mutaciones en los genes RAG-1 y 2 desarrollaban tumores espontáneos (neoplasias) a partir de los trece meses de edad (57), de forma semejante a lo que ocurría en los ratones con mutaciones en los genes *IFNGR1<sup>-/-</sup>* o *STAT1<sup>-/-</sup>*, así como en tumores inducidos por MCA (58).

#### **4.2. Evidencias observacionales de inmunovigilancia en humanos**

Los experimentos en modelos animales demostraron la capacidad del sistema inmunitario de suprimir la aparición de tumores, tanto esporádicos como inducidos por fármacos. Estos resultados, si bien no pueden ser replicados a nivel experimental, son consistentes con una serie de hechos observables en distintas patologías humanas que conllevan inmunosupresión.

- Inmunodeficiencias adquiridas: En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA), se halló un aumento en la frecuencia de aparición de tumores malignos asociados a infecciones virales, principalmente sarcoma de Kaposi, linfoma no-Hodgkin de células B y cáncer de cérvix (59). Sin embargo, la susceptibilidad a este tipo de tumores puede verse incrementada por el hecho de que los pacientes con SIDA poseen mayor susceptibilidad a infecciones virales, muy ligadas al desarrollo de este tipo de patologías.

- **Cáncer pos-trasplante:** El tratamiento principal para evitar el rechazo del injerto en pacientes trasplantados consiste en la administración de fármacos inmunosupresores. Uno de los principales riesgos en el trasplante consiste en un aumento en el riesgo de infecciones, como las víricas, mencionadas en el apartado anterior. De forma secundaria e independiente a las infecciones víricas, existe un incremento en la aparición de tumores esporádicos, bien por la propia inmunosupresión farmacológica, como por la preexistencia de células malignas en el órgano trasplantado que, libre de la presión que recibía en el organismo inmunocompetente del donante, es capaz de progresar e invadir tejidos distales del receptor (60). Esto evidencia que, en un entorno inmunosuprimido, los tumores silentes saltarían las fases de eliminación y equilibrio, progresando con facilidad hacia estadios más graves de la enfermedad.
- **Infiltración linfocitaria en tumores y neoantígenos reconocidos por el sistema inmunitario:** El hecho de que los tumores sólidos se encuentren frecuentemente infiltrados por células del sistema inmunitario adaptativo, y que estos infiltrados tengan implicación en el pronóstico de la enfermedad, pone de manifiesto que la elaboración de una respuesta inmunitaria adecuada puede condicionar la eliminación o progresión del cáncer (61). Además, la alta frecuencia de mutaciones, y el hecho de que existan antígenos específicos y exclusivos en los pacientes con cáncer, refuerza la idea de que, en determinados tumores, se generan respuestas neo-antígeno específicas contra las células malignas (62). De la misma forma, aquellos tumores fríos (sin infiltrados linfocitarios) presentan peor pronóstico que los tumores cálidos, así como una menor respuesta a tratamientos basados en la estimulación de la respuesta inmunitaria contra tumores (49).

Por tanto, aunque estos hechos no demuestran el proceso de inmunovigilancia o inmunoedición, sí deja de manifiesto la existencia de respuestas inmunitarias contra tumores.

## 5. Inmunoterapia del cáncer

Los tratamientos basados en potenciar la respuesta inmunitaria contra el cáncer, o aprovecharse de los mecanismos celulares para la eliminación de tumores, reciben el nombre de inmunoterapia del cáncer. Este tipo de terapias actúan a distintos niveles de la respuesta inmunitaria frente a los tumores.

### 5.1. Administración de interferón-gamma (IFN $\gamma$ )

La molécula de IFN $\gamma$  actúa como señal de daño celular y tisular. Esta molécula es sintetizada principalmente por células del sistema inmunitario, y de forma mayoritaria por linfocitos T (como los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor) y células NK, en respuesta a diversos estímulos inflamatorios, como la señalización a través del TCR o de los receptores para las citoquinas IL-12 e IL-18 (63, 64). IFN $\gamma$  ejerce su función a través de su receptor heterotetramérico formado por *IFNGR1* e *IFNGR2* y la vía JAK/STAT. Entre sus funciones relacionadas con la respuesta inmunitaria contra el cáncer, destacan el incremento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), permitiendo la presentación de neoantígenos en células tumorales (65, 66). IFN $\gamma$  también ejerce funciones antiproliferativas directas sobre las células tumorales, activando la expresión de moléculas que inhiben la progresión del ciclo celular, como p27Kip, p16 o p21 (67, 68).

Por tanto, la administración exógena de IFN $\gamma$  podría permitir una eliminación más eficiente de las células tumorales. Actualmente, hay una serie de ensayos clínicos tratando de probar los efectos de esta citoquina en distintos tipos tumorales, como glioblastoma, cáncer de mama, liposarcoma, etc (69).

Sin embargo, IFN $\gamma$  puede promover la expresión de moléculas supresoras del sistema inmunitario, como PDL1, en la superficie de las células tumorales, lo que evitaría su eliminación mediada por las CTL y las NK.

### 5.2. Terapia con virus oncolíticos

La administración de virus oncolíticos atenuados, en muchas ocasiones modificados para que adquieran tropismo hacia las células tumorales, permite potenciar o generar una respuesta inmunitaria frente a tumores poco inmunogénicos (70). La infección propiciaría la eliminación de las células

tumorales, tanto por efecto del propio virus como por la respuesta inmunitaria frente a infecciones virales (semejante a la respuesta inmunitaria antitumoral). Esta destrucción de tejido tumoral genera un efecto en cadena, similar a la fase de eliminación, generando un ambiente pro-inflamatorio, con potencial para eliminar a las células tumorales (71). Actualmente, la única terapia viral oncolítica aprobada por la FDA es el talimogén laherparepvec (T-Vec o Imlígico), un virus herpes simple tipo 1 atenuado, para su uso en el melanoma metastásico, aunque desde el año 2016 existen una serie de virus en ensayos clínicos de fase I, II y III.

### **5.3. Anticuerpos monoclonales**

Algunos tipos tumorales presentan en sus membranas celulares ciertos antígenos, relacionados con la adquisición de mutaciones malignas. Estos antígenos se clasifican en función de sus patrones de expresión en los tejidos sanos del que evolucionan las células tumorales. Esta clasificación incluye 1) los antígenos virales, expresados en células infectadas por virus que han sufrido una alteración maligna, 2) péptidos mutados, que adquieren las propiedades necesarias para unirse a moléculas de HLA de clase I, 3) genes normalmente expresados en línea germinal, reactivados en células tumorales por una demetilación completa de su genoma, 4) antígenos procedentes de células poco diferenciadas, que se expresan en el tumor y son presentados por su HLA de clase I, y 5) proteínas normales que, en las células malignas, ven alterada su regulación transcripcional y post-transcripcional, provocando la sobreexpresión de la molécula, pudiendo actuar como antígenos de baja afinidad (40).

Estos antígenos han sido clasificados como antígenos asociados a tumores (TAA, en sus siglas en inglés), autoantígenos que se expresan de forma preferente o anormal en las células tumorales, pero que también pueden expresarse en algún nivel en las células normales (antígeno prostático, HER2), y los antígenos específicos de tumor (TSA, en sus siglas en inglés), compuestos por antígenos expresados por oncovirus (antígenos de virus de papiloma humano) y neoantígenos codificados por

mutaciones del cáncer (*BRAF*<sup>V600E</sup>) y que, por tanto, son verdaderamente específicos del tumor (72).

A raíz de estos antígenos asociados a tumores, se han podido desarrollar una serie de anticuerpos monoclonales contra estas dianas. Estos anticuerpos tienen como objetivo el bloqueo de la función de estas moléculas en la superficie, además de exponer las regiones Fc para permitir el mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, en sus siglas en inglés), por el cual distintas células efectoras son capaces de eliminar células opsonizadas por anticuerpos, a través de sus receptores para Fc (73). Desde 1997, se han diseñado y testado 27 anticuerpos monoclonales, que finalmente fueron aprobados por la FDA, para el tratamiento de diversos tipos de tumores (74), así como los que se encuentran actualmente en ensayos clínicos. Algunos de los más relevantes son rituximab (anti-CD20) para la leucemia linfocítica crónica, cetuximab (anti-EGFR) para tumores epiteliales que sobre-expresan EGFR, y trastuzumab (anti-HER2), utilizado en cáncer de mama y gástrico HER2-positivos (75). El mecanismo de acción de este último anticuerpo monoclonal, así como la alteración de su diana, será detallado en un apartado propio de la introducción, pues supone uno de los puntos de partida para uno de los abordajes experimentales de esta tesis doctoral.

#### **5.4. Vacunas contra el cáncer**

De forma similar a los anticuerpos monoclonales, el desarrollo de vacunas contra el cáncer tiene como objetivo generar una respuesta inmunitaria frente a antígenos asociados a tumores y antígenos específicos de tumor. Al contrario que el diseño de anticuerpos monoclonales, este tipo de aproximación permitiría la activación de varias respuestas del sistema inmunitario, desde la producción de anticuerpos hasta la activación de células de la respuesta inmunitaria adquirida (linfocitos T CD4 y CD8). En este caso, emplear antígenos asociados a tumor podría generar reacciones autoinmunes adversas, pues se provocaría la ruptura de la tolerancia para ciertos antígenos, mientras que los antígenos específicos de tumor (especialmente, aquellos que aparecen con una elevada frecuencia) generarían respuestas específicas contra los tumores, con bajo riesgo de provocar efectos adversos (72).



## 5.5. **Bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario**

Además de este tipo de estrategias, los anticuerpos monoclonales pueden emplearse para bloquear otro tipo de moléculas relacionadas con el sistema inmunitario. Esto son los anticuerpos bloqueantes de puntos de control (*checkpoint inhibitors*, en inglés).

Esta terapia se basa en bloquear moléculas que están implicadas en la regulación del sistema inmunitario, y que en cáncer están implicadas en los mecanismos de inactivación y de anergia de las células inmunitarias.

Las principales moléculas empleadas en terapia son (ver figura 3):

- CTLA-4: Esta molécula es un homólogo de CD28 (molécula colaboradora en la presentación antigénica), presente en los linfocitos T, con una alta afinidad por las moléculas B7 (CD80 y CD86). La unión de B7 a CTLA-4 no produce señalización a nivel intracelular, por lo que esta interacción CTLA-4:B7 ejerce una inhibición competitiva con CD28, impidiendo la estimulación de los linfocitos T tras la presentación antigénica. Este mecanismo funciona como método de control y de mantenimiento de la tolerancia periférica: tras la activación de los linfocitos T, CTLA-4 se transporta de sus compartimentos intracelulares a la membrana celular, donde aumenta su concentración y compite con CD28. La pérdida CTLA-4 conduce a la aparición de enfermedades autoinmunes en modelos de ratón, mientras que en cáncer se emplea como diana terapéutica para potenciar la respuesta inmunitaria contra los tumores (76). El anticuerpo monoclonal ipilimumab se une a CTLA-4, bloqueando la interacción de CTLA-4 con B7 y, por tanto, permitiendo la co-estimulación a través de CD28 (77). Actualmente, ipilimumab está aprobado por la FDA para su empleo en melanoma metastático o irresecable.
- Vía PD1/PDL1: Al igual que CTLA-4, esta vía de señalización está implicada en procesos de tolerancia y el control del daño tisular provocado por la activación del sistema inmunitario durante periodos prolongados (como ocurre en infecciones crónicas) (78), como se ha demostrado en

modelos de ratón deficientes del gen *Pdcd1* (que codifica para la proteína PD1), donde los animales eran capaces de acabar con la infección con mayor eficiencia, pero causando un elevado daño hepático a causa de la inflamación exacerbada (79). Además, defectos en PD1 están asociados a un incremento en el desarrollo de procesos autoinflamatorios, relacionados con una pérdida de la tolerancia periférica (80).

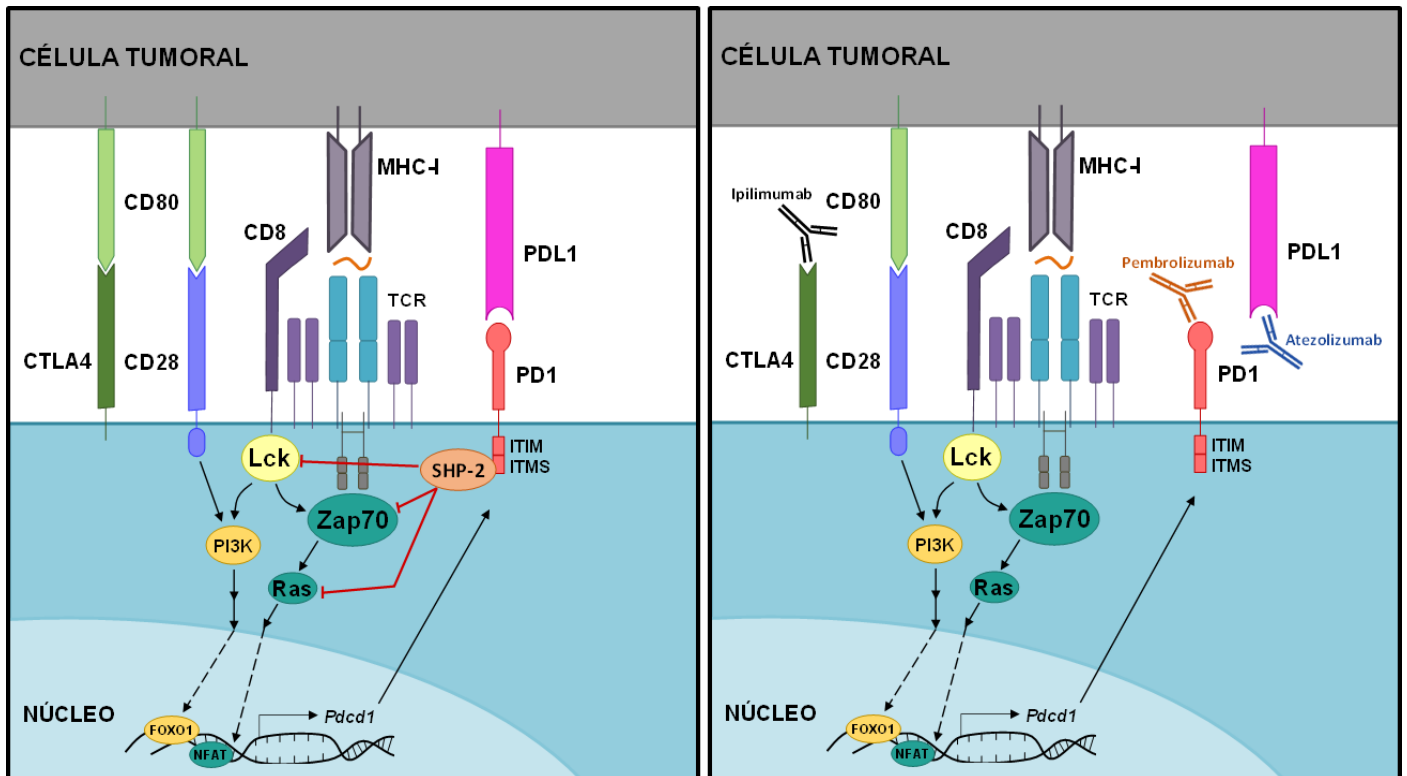
El mecanismo de esta molécula se asemeja al de CTLA-4: Los linfocitos T, tras su estimulación a través del TCR, activan el gen *Pdcd1*, expresando PD1 en la membrana plasmática. La unión de PD1 a sus ligandos, PDL1 y PDL2, provoca la fosforilación de los dominios ITSM e ITM, permitiendo la unión de SHP2, que inhibe la activación, mediada por el TCR y CD28, de los linfocitos T (81).

Por tanto, en procesos de estimulación crónica del sistema inmunitario, como es el caso de procesos tumorales con ambientes inflamatorios, los linfocitos T expresan altas cantidades de PD1 en su membrana plasmática y, en el caso de los tumores que expresan ligandos para PD1, la unión de PD1 a sus ligandos conduce los linfocitos T a un estado de anergia, que impide la eliminación de las células tumorales. El bloqueo de esta vía de señalización mediante anticuerpos específicos para PD1 (nivolumab, pembrolizumab) o PDL1 (atezolizumab) permite a los linfocitos T evadir la supresión mediada por las células tumorales a través de esta vía (82).

Hasta la fecha, la FDA ha aprobado estos el uso de estos anticuerpos monoclonales para melanoma metastásico, cáncer colorrectal MSI-H, cáncer renal, cáncer de pulmón metastásico, cáncer de cabeza y cuello en progresión, cáncer urogenital avanzado y metastásico, cáncer gástrico metastásico PD-L1 positivos, entre otros (82, 83).

El desarrollo y aplicación de este tipo de terapias adquirieron mucha relevancia en el año 2018 en el que se otorgó el premio Nobel de Medicina a James P. Allison y Tasuku Honjo, por la terapia anti-CTLA-4 y anti-PD1, respectivamente (84).

Sin embargo, aunque estas terapias tienen resultados muy esperanzadores de cara al tratamiento de tumores sólidos, con tasas de respuesta mayores a las obtenidas con los tratamientos clásicos (85-90), sigue existiendo un gran número de pacientes que no se benefician de este tipo de terapias. Esto es debido a que, actualmente, no existen buenos biomarcadores individuales capaces de predecir pacientes respondedores, especialmente en lo referente a marcadores medidos en sangre periférica (91-93).



**Figura 3.** Puntos de control del sistema inmunitario e inmunoterapia anti-CTLA4 anti-PD1 y anti-PDL1.

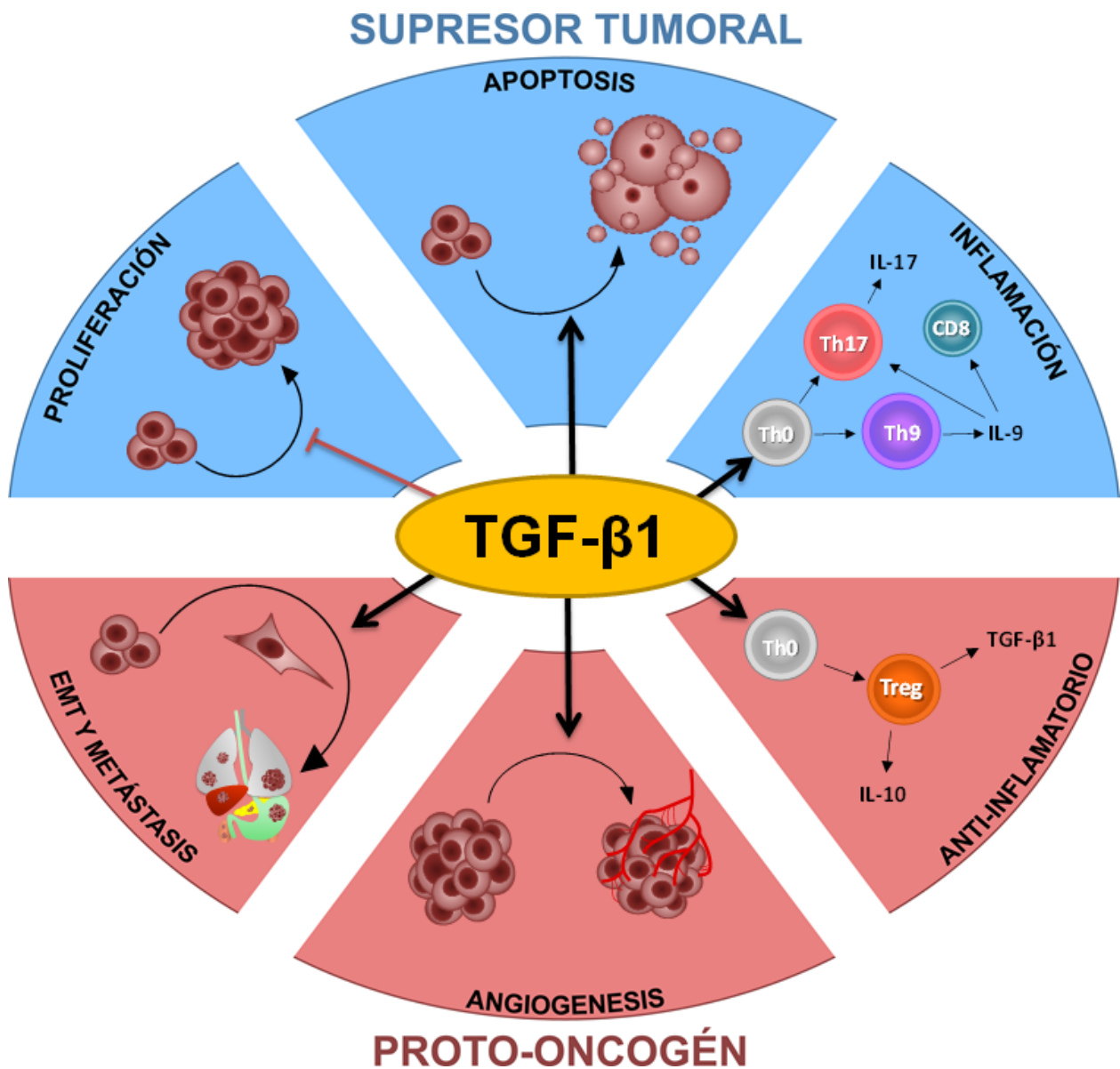
Panel izquierdo: CTLA4 compite directamente con CD28 por su unión a CD80, impidiendo la co-estimulación CD28-CD80. Por otro lado. La activación de la señalización a través del TCR y moléculas co-activadoras implica la activación de las vías Lck, Zap70 y PI3K, que culminan en los factores de transcripción NFAT y FOXO1, estimulando la expresión del gen *Pdcd1*, que codifica para la proteína PD1 en la superficie del linfocito T. La unión de PD1 a su ligando PDL1 lleva a fosforilación de los dominios ITIM e ITMS de PD1, que recluta la proteína SHP-2, a través de la cual se produce la inhibición de diversas moléculas de la señalización del TCR, como Lck, Zap70 y Ras. Ambas moléculas, por tanto, son capaces de inhibir la actividad del linfocito T y llevarle a un estado de anergia.

Panel derecho: Las terapias basadas en anticuerpos monoclonales que bloquean CTLA4 (ipilimumab), PD1 (pembrolizumab) y PDL1 (atezolizumab), por tanto, bloquean este mecanismo de control del sistema inmunitario, lo que permite a los linfocitos T permanecer activos y, en última instancia, eliminar las células tumorales.

## **6. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y vía de las SMAD**

TGF- $\beta$  es una citoquina que juega un papel doble en el desarrollo y la progresión de los tumores sólidos. Por un lado, es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales a través de su vía canónica, SMAD2/3 y SMAD4 (94), o activar la movilización de las mismas mediante la activación de vías no canónicas (JNK, MAPK, p38) en tumores avanzados e invasivos (95), que lleva a procesos de angiogénesis, EMT y metástasis. La señalización a través de la vía de las proteínas SMAD también provoca la inactivación de las células del sistema inmunitario, lo que puede limitar su respuesta frente a los tumores (96), si bien también permite la diferenciación y activación de algunos tipos de linfocitos T pro-inflamatorios, como las Th17, Th9 y las células T residentes de memoria (Trm), en particular de tipo CD8+, que se han asociado con la resistencia a tumores en diversos modelos animales (97) (ver figura 4).

Este efecto dual hace a TGF- $\beta$  una molécula de particular interés para el desarrollo de los tumores de origen epitelial. En cáncer colorrectal, la inactivación de la vía de TGF- $\beta$  está muy bien descrita, y forma parte del proceso de transformación de las células del epitelio del colon en fase de adenoma a adenocarcinoma (98). La sobreexpresión de TGF- $\beta$  en el entorno del tumor implicó un menor número de tumores producidos por carcinógenos (AOM y DSS), al contrario de lo que ocurre inactivando el receptor TGFBRII. De igual manera, se demostró que los tumores de colon sin displasia expresaban altos niveles de TGFBRI, que se perdía al desarrollar displasia (99).



**Figura 4.** Mecanismos pro y anti-tumorigénicos del TGFβ1. Los efectos de esta de esta citoquina van desde la supresión tumoral y la inhibición del sistema inmunitario hasta promover la angiogénesis y la transición Epitelio-Mesénquima (EMT).

Existen tres moléculas de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), cuyos genes se localizan en las regiones cromosómicas 19q13.2, 1q41, and 14q24.3, respectivamente. Si bien son estructuralmente similares, TGF- $\beta$ 1 es la molécula más estudiada en el contexto de la respuesta inmunitaria y el desarrollo y evolución del cáncer. La expresión de TGF- $\beta$ 1 está regulada a varios niveles (ver figura 5):

- Transcripcional: El promotor del gen *TGFB1* es sensible a la activación de diversas vías de señalización, como ERK/MAPK, p38, IKK/NF- $\kappa$ B y GSK3 $\beta$ /CREB, Akt/mTOR (100, 101) y la propia TGF- $\beta$ 1/SMAD, todas ellas, principalmente, a través de los factores de transcripción AP-1, Egr-1, y Sp-1 (102). Por tanto, la activación de diversos receptores celulares puede llevar a la activación transcripcional del gen *TGFB1*, principalmente aquellas relacionadas con la respuesta inmunitaria y daño celular, como los TLR, receptores de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-1) y factores de crecimiento (EGF).

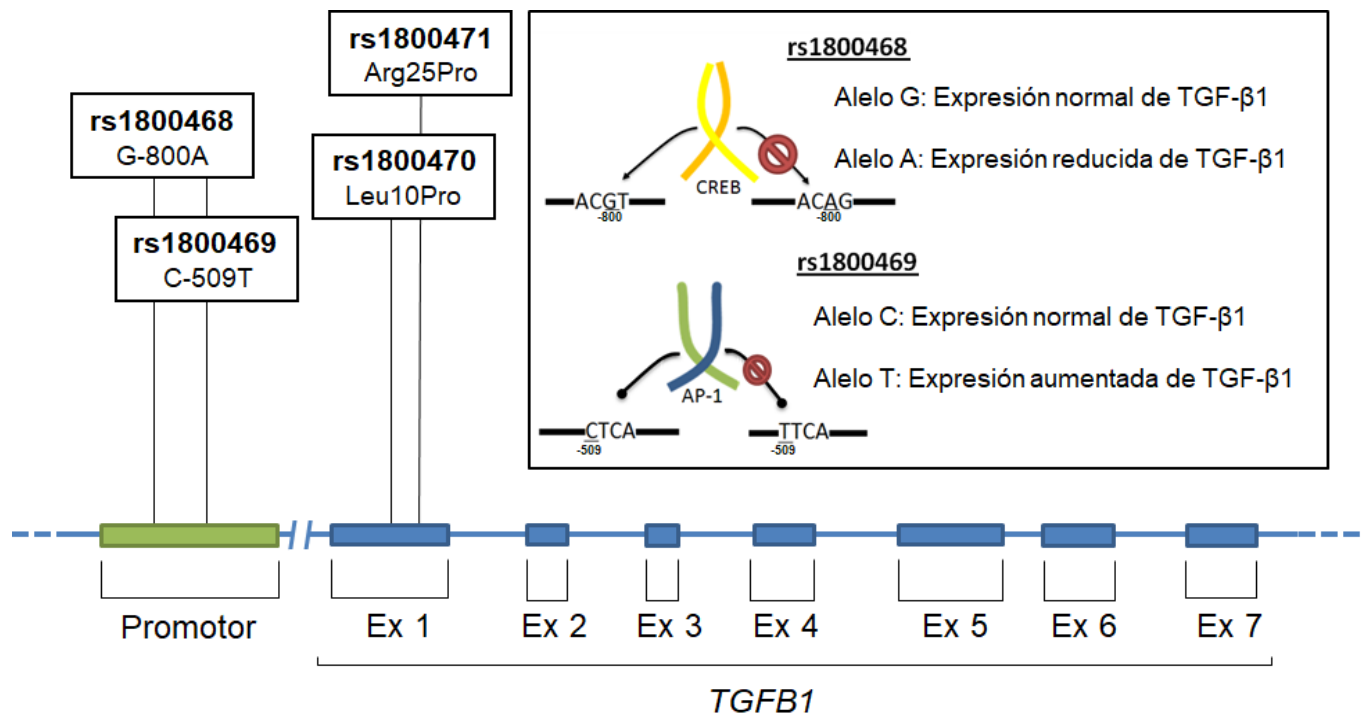
Con respecto a la región promotora, existen una serie de variantes polimórficas que son capaces de alterar la regulación transcripcional de este gen, como son los polimorfismos de base única (SNPs) rs1800468 (G-800A) y rs100469 (C-509T) (102).

- Transporte: El exón uno del gen *TGFB1* codifica para un péptido señal, que dirige el transporte del precursor de TGF- $\beta$ 1 hacia el espacio extracelular. En esta región existen diferentes polimorfismos que afectan a la secuencia del péptido señal: el cambio de una leucina a una prolina en la posición 10 (Leu10Pro) (102) y la sustitución de una arginina por una prolina en la posición 25 (103). En ambos casos, la presencia de una prolina implicaría un defecto en el transporte de TGF- $\beta$ 1 y, por tanto, menores niveles de expresión de la misma.

Procesamiento: TGF- $\beta$ 1 se sintetiza como una proteína latente, de gran tamaño (aproximadamente 50kDa), formada por la propia citoquina, el péptido LAP (Latency Associated Protein, en inglés), que se mantienen unidos mediante fuerzas no-covalentes, y la proteína unida a TGF- $\beta$  latente (LTBP), que permite la unión de este complejo a moléculas de la matriz extracelular, como fibronectina. Finalmente, TGF- $\beta$ 1 puede ser

liberado por una serie de mecanismos (integrinas, metaloproteasas de matriz, etc), dando lugar a la citoquina activa, que puede unirse a su receptor, TGFBR2 (103, 104).

Los mecanismos de control de esta citoquina son fundamentales en distintas patologías, así como en el desarrollo y progresión de los tumores, como así sugieren varios estudios de asociación de polimorfismos y de modificación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 (105, 106).



**Figura 5.** Mecanismos de control de la expresión de TGF- $\beta$ 1. Los polimorfismos del promotor (rs1800468 y rs1800469) provocan cambios en dianas de factores de transcripción, que condicionan cambios en la expresión del ARN y, por ello, de la proteína en determinados contextos celulares. De igual manera, los polimorfismos presentes en el exón 1 (rs1800470 y rs1800471), que codifica para el péptido señal, pueden influir en el transporte de esta proteína hacia el medio extracelular.



## 7. Cáncer gástrico

El cáncer gástrico es el quinto tipo de tumor maligno más frecuente en la población mundial, con más de un millón de nuevos casos en el año 2018, siendo la tercera causa de muerte por cáncer (780.000 muertes en 2018) (107).

### 7.1. Clasificación de los tumores gástricos

Los tumores gástricos pueden clasificarse empleando varios criterios:

- Origen de la enfermedad (108):
  - Cáncer gástrico esporádico: El 80% de los tumores de estómago son esporádicos, es decir, surgidos de forma espontánea como resultado de la interacción entre factores genéticos preexistentes en el paciente y factores ambientales. Es el doble de frecuente en varones de edad avanzada.
  - Cáncer gástrico de aparición temprana: Aparecen a edades inferiores a los 45 años y son más frecuentes en mujeres. Representan el 10% del total.
  - Cáncer de muñón gástrico: El 7% de los tumores gástricos, cuya aparición viene precedida de una displasia, en ocasiones debida a una gastrectomía previa.
  - Cáncer gástrico difuso hereditario: Debidos a la mutación autosómica dominante del gen *CDH1* (E-Cadherina). Son el 3% restante, y todos son de tipo difuso.
- Clasificación de Lauren (109):
  - Difuso: Formado por células poco diferenciadas, infiltrantes de la pared gástrica, y carentes de estructuras glandulares. En ocasiones, presenta un tipo celular muy característico denominado “células en anillo de sello”.
  - Intestinal: Caracterizado por la formación hiperplásica de glándulas, y está asociada a una metaplasia intestinal previa y a la infección de *Helicobacter pylori*. Dentro de este tipo, se pueden identificar los subtipos tubular, papilar y mucinoso.

- Mixto: Compuesto por un tejido mixto que incluye tumor glandular y tumor difuso.
- Clasificación molecular (110, 111):
  - Tumores con inestabilidad microsatélite (MSI): Tumores con alteración en los genes del sistema de reparación de errores del ADN (dMMR, en sus siglas en inglés), formado por los dímeros MSH2/MSH6 y MLH1/PMS2 (112). Esto provoca la aparición de alteraciones diversos genes de las células tumorales, y se refleja en cambios en las regiones microsatélite, regiones cortas de ADN repetidas en tándem (de 10 a 60 veces). Este tipo de tumores tienen una alta frecuencia de mutaciones somáticas de alteración del marco de lectura y de cambio de base, que incrementan la aparición de neo-antígenos. Esto condiciona que estos tumores sean más inmunogénicos que el resto y, por tanto, más susceptibles de beneficiarse de inmunoterapia.
  - Tumores genéticamente estables (GS): Al contrario que los tumores MSI, es un subtipo de tumor que carece de mutaciones distintivas y, por tanto, posee menos frecuencia de neoantígenos. Suelen presentar mutaciones en la vía de GTPasas de la familia Rho (RhoA y GAP, principalmente).
  - Tumores infectados por el virus Epstein-barr (EBV): Caracterizados por los tumores gástricos de etiología viral, y presentan una alta tasa de hipermetilación en las islas CpG.
  - Tumores con inestabilidad cromosómica (CIN): Tumores con una alta tasa de aneuploidías, pérdida de heterocigosidad y amplificaciones genéticas que afectan a receptores tirosina-kinasa. En este subgrupo se ha encontrado una alta frecuencia de mutaciones que afectan a EGFR, ERBB2 (HER2) y ERBB3.

Esta clasificación molecular, además, está ligada a la localización espacial de estos tumores en el estómago (113), siendo los de tipo GS lo más extendidos por todo el estómago, siendo mayoritariamente de tipo difuso según la clasificación de Lauren y presentando mutaciones en los genes CDH1 y Rho; el subtipo EBV en el cuerpo del estómago, con mayor prevalencia en pacientes

jóvenes, los tumores CIN, localizados principalmente en el cardias; y los MSI, localizados en la región distal del estómago y, normalmente, de tipo intestinal.

## **7.2. Respuesta inmunitaria en el cáncer gástrico**

La respuesta inmunitaria frente a las células tumorales depende de la detección de estas células malignas por parte del sistema inmunitario, que pasa por la detección de antígenos específicos de las células tumorales (neo-antígenos), que depende directamente de la carga mutacional del tumor primario. Los tumores EBV y MSI presentan una mayor tasa de mutaciones somáticas y, por tanto, expresan más neo-antígenos reconocibles por el sistema inmunitario. Los subtipos GS y CIN, por el contrario, son tumores menos inmunogénicos, ya que su carga mutacional y expresión de neo-antígenos es menor que en el resto de los subtipos.

Al igual que ocurre en el cáncer colorrectal, aquellos tumores con una elevada carga de mutaciones somáticas tienen una mayor infiltración de linfocitos CD3, CD4 y CD8 (CTL) (114). Los tumores más inmunogénicos no solo presentan una elevada infiltración linfocitaria, si no que estos TIL expresan moléculas reguladoras de la respuesta inmunitaria, como PD1, CTLA4 y LAG3, (todos ellos incrementados al momento de su activación), así como una alta expresión de PDL1 en las células tumorales (115, 116). Estos datos apoyan la idea, no solo del incremento de infiltrado en aquellos tumores con mayor carga mutacional, si no que estos mismos pacientes pueden beneficiarse de terapias anti-puntos de control del sistema inmunitario, al expresar las dianas para los anticuerpos bloqueantes utilizados en terapia (como ipilimumab, nivolumab, atezolizumab y pembrolizumab).

### **Cáncer gástrico e Inmunoterapia**

El cáncer gástrico es uno de los 10 tipos de tumores con mayor prevalencia de mutaciones somáticas (117), lo que permite utilizar esas alteraciones en beneficio de distintos tipos de terapias relacionadas con el sistema inmunitario (inmunoterapia). Actualmente, existen varias

alternativas basadas en inmunoterapia para el tratamiento del cáncer gástrico:

- Terapia con anticuerpos monoclonales anti-HER2 (Trastuzumab): El uso de anticuerpos monoclonales anti-HER2 (descrito en el apartado “Inmunoterapia del cáncer”) ha demostrado ser un tratamiento efectivo en primera línea para los tumores gástricos HER2+ (117), cuya amplificación del gen o sobreexpresión de proteína se determinó mediante FISH e IHC, respectivamente.
- Terapia celular adoptiva: La expansión, activación y reintroducción de células del sistema inmunitario, principalmente linfocitos, se ha postulado como una de las terapias alternativas para el tratamiento del cáncer gástrico. En concreto, la terapia adoptiva con linfocitos citotóxicos inducidos por citoquinas (células CIK) parece implicar un aumento de la supervivencia en este tipo de pacientes, en combinación con quimioterapia (118).
- Inhibidores de puntos de control del sistema inmunitario: Diversos ensayos clínicos han demostrado la eficacia de distintos anticuerpos bloqueantes de puntos de control del sistema inmunitaria, como anti-PDL1 (pembrolizumab) (119, 120); y anti-PD1 (nivolumab) (121). Sin embargo, solo utilizan como potenciales marcadores con valor predictivo la expresión de PDL1, determinando en algunos casos un mayor beneficio de este tipo de inmunoterapia en los pacientes PDL1-positivos (122). Hasta la fecha, no existen marcadores en sangre que predigan eficazmente la respuesta a inmunoterapia anti-puntos de control. Actualmente, únicamente pembrolizumab está aprobado para su uso en pacientes con cáncer gástrico localmente avanzado o metastásico, recurrentes y cuyos tumores expresen PDL1 (83).

## **8. TGF- $\beta$ 1 y cáncer gástrico.**

La molécula TGF- $\beta$ 1 está implicada en el desarrollo y evolución de distintos tumores de origen epitelial, principalmente en el cáncer colorrectal, donde mutaciones en la vía de TGF- $\beta$  agravan el proceso de carcinogénesis (98, 123). Si bien se han encontrado niveles elevados de esta citoquina en suero de pacientes con cáncer gástrico, relacionándose con mal pronóstico (124), se ha

descrito que mutaciones que afectan a la vía canónica de TGF- $\beta$ , como la inactivación de TGFBR2 (125) o SMAD3 (126) incrementan la desarrollo del cáncer gástrico.

Por tanto, el papel de esta citoquina en el desarrollo y la evolución del cáncer gástrico no está completamente establecido, pudiendo actuar, incluso en los mismos tumores, como molécula pro-oncogénica o supresora, en función de la fase de desarrollo en la que se encuentre el tumor primario.

Además de su función en el contexto del desarrollo tumoral, TGF- $\beta$ 1 tiene la capacidad de regular la activación del sistema inmunitario. Sin embargo, los ensayos clínicos centrados en la inhibición la señalización por TGF- $\beta$ 1 no han resultado particularmente efectivos, probablemente debido a la gran variedad de procesos regulados por esta citoquina (127). En la actualidad, los ensayos clínicos que involucran a esta citoquina en combinación con inhibidores de puntos de control se encuentran en fase de reclutamiento o en las primeras fases del ensayo (128).

## **9. HER2 y cáncer gástrico.**

### **9.1. HER2: Molécula y señalización en cáncer**

HER2 (erbb2) es una molécula de superficie, de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), junto con otras tres proteínas: EGFR (HER1, erbb1), HER3 (erbb3) y HER4 (erbb4). Posee un tamaño de 184kDa, y el gen que codifica para HER2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 17. Al contrario que otras proteínas de la familia EGF, HER2 carece de ligando conocido, y su mecanismo de acción está ligado a la heterodimerización del mismo con otros receptores pertenecientes a la familia EGF, principalmente como HER2-EGFR, e incluso en un homodímero constitutivamente activo HER2-HER2 (129). En aquellos tumores donde existe sobre-expresión de la molécula HER2, la formación espontánea de homodímeros HER2-HER2, a causa de su aumento de concentración en la membrana celular, provoca una activación constitutiva de su vía de señalización (principalmente PI3K/AKT)

confiriéndole a las células tumorales alta capacidad proliferativa y migratoria, así como un aumento de la supervivencia (130).

El mecanismo principal de sobreexpresión de HER2 consiste la alteración del número de copias del gen que codifica para HER2, que puede ocurrir mediante diversos mecanismos de amplificación genética (131), si bien estas hipótesis no están del todo demostradas, siendo los mecanismos de generación de estas duplicaciones aún poco conocidos.

## **9.2. HER2 en la clínica**

Como se introdujo en apartados anteriores, el anticuerpo monoclonal anti HER2 (Trastuzumab) ha supuesto un aumento de la supervivencia global de los pacientes con cáncer de mama (cercana a un incremento del 40%) (132), así como en los pacientes con cáncer gástrico HER2-positivos, en combinación con quimioterapia (117).

El mecanismo de acción de este anticuerpo consiste en el bloqueo de la molécula HER2, a la vez que “marca” las células tumorales para su eliminación, a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ver el apartado de Inmunoterapia con anticuerpos monoclonales).

Para que esta terapia sea efectiva, es necesario que exista la sobreexpresión de la molécula HER2 en la superficie de las células tumorales. Este tipo de alteración es altamente frecuente en una población de pacientes con cáncer de mama (133), y antes de presentar tratamiento, suponía uno de los marcadores de peor pronóstico de esta patología.

En la clínica, el empleo de terapia anti-HER2 pasa por identificar aquellos pacientes que presentan estas amplificaciones genéticas y sobreexpresión de HER2 en la membrana de las células tumorales, empleando para ello dos metodologías principales:

- Hibridación fluorescente in situ (FISH): Empleando sondas fluorescentes que hibridan ADN, se identifica la proporción de genes HER2 con respecto a un gen marcador no amplificado, generalmente *CEP17*. Este cociente, en células sanas, será de 2 genes *HER2* y 2 genes *CEP17*, mientras que en el caso de los tumores HER2-positivos, los cocientes *HER2/CEP17*

superan el valor 2,2; generalmente utilizado en la práctica clínica como valor de corte positivo en cáncer de mama, siendo los valores equívocos 1.8-2.2 (134).

- Inmunohistoquímica (IHC): Empleando un anticuerpo monoclonal anti-HER2 en cortes de tejido, se puede determinar la sobreexpresión de HER2 en los tumores sólidos. El anticuerpo empleado para el análisis de HER2 suele ser Herceptest (Dako), aprobado por la FDA, aunque el anticuerpo empleado puede variar entre laboratorios. Las tinciones se estratifican en función de la señal de IHC en IHC-0, IHC-1 (negativas), IHC-2 y IHC-3, considerándose equívoco el valor IHC-2 en determinadas situaciones.

Ambas aproximaciones presentan ciertas inconvenientes a la hora de determinar si realmente existe o no amplificación de HER2, siendo los principales problemas la subjetividad en la valoración de los resultados, así como las limitaciones de las técnicas utilizadas, como son la superposición de señales, los criterios de evaluación en tumores heterogéneos y los problemas derivados del muestreo de los tejidos (cortes histológicos, que no incluyen una parte representativa de la muestra) (135, 136).

Por lo tanto, un sistema de evaluación de HER2 complementario, preciso y fiable, junto con la información clínica, sería de gran utilidad para identificar aquellos pacientes con cáncer gástrico adecuados para la inmunoterapia anti-HER2.

### **9.3. HER2 en cáncer gástrico**

En el cáncer gástrico también se ha descrito la amplificación del gen HER2, los cuales tendrían una mayor capacidad invasiva y proliferativa, según lo descrito en el apartado anterior. Aunque se ha demostrado un aumento en el número de copias del gen *HER2* en algunos pacientes con cáncer gástrico (10 a 30%), diferentes autores y meta-análisis difieren en términos del número real de pacientes que sobreexpresan la proteína, así como en el efecto de dicha sobre-expresión en el pronóstico de la enfermedad (137-140).

Al igual que ocurre en el cáncer de mama, se aplican las técnicas de FISH e IHC para la determinación de amplificaciones y sobre-expresión de HER2, por lo que parte de las discrepancias podrían explicarse por las dificultades técnicas de los métodos de detección utilizados, lo que podría solucionarse empleando métodos complementarios que impliquen técnicas con resultados más objetivos y directos, como aquellas que se basen en biología molecular.

## **10. Inmunoterapia en cáncer gástrico**

Al igual que en otros tumores sólidos, en la actualidad existen distintos abordajes terapéuticos con base en la inmunoterapia. Entre todos, destacan en uso de anticuerpo monoclonales frente a HER2 y los inhibidores de puntos del control del sistema inmunitario.

### **10.1. Anticuerpos anti-HER2 en cáncer gástrico**

Actualmente, la FDA ha aprobado Trastuzumab, en combinación con cisplatino y capecitabina o 5-fluorouracilo, para el tratamiento de pacientes con tumores gástricos o de unión gastro-esofágica metastásicos que sobre-expresen HER2 y no hayan recibido terapia anteriormente (CITAR FDA). Este tratamiento, por tanto, excluye los tumores en fases tempranas del desarrollo, expresen o no HER2. Varios autores han descrito la expresión de HER2 en tumores en estadios tempranos y no invasivos, e incluso han descrito las amplificaciones de HER2 como un suceso frecuente en los inicios de la patología, mostrando una gran heterogeneidad intratumoral en varios casos (141, 142).

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el hecho de que los tumores presenten tanta heterogeneidad dificulta la identificación correcta de tumores HER2-positivos, interfiriendo por tanto en el tratamiento de estos pacientes, como ya se ha demostrado en pacientes con cáncer de mama (143).

### **10.2. Inhibidores de puntos de control en cáncer gástrico**

Actualmente, la FDA ha aprobado el tratamiento con inmunoterapia en dos casos concretos de tumores gástricos: En mayo de 2017, se aprobó pembrolizumab en tumores sólidos avanzados con defectos en el sistema de reparación o MSI+ que han progresado en tratamientos anteriores o para los que no existe ningún otro tratamiento estándar, y que expresen PDL1.



En el primer caso, la tasa de respuesta fue del 60%, mientras que en el estudio KEYNOTE-59, fue de un 15%. Por tanto, queda claro que la inestabilidad microsatélite puede ser un buen marcador de respuesta en los pacientes con cáncer gástrico. Sin embargo, la alta heterogeneidad de los tumores provoca que, en ocasiones, no sea tan sencillo atribuir la característica MSI+ a un tumor concreto, requiriendo en diversas ocasiones una nueva biopsia.

Lo mismo ocurre para la determinación de PDL1, empleada en el estudio KEYNOTE-59 como posible marcador de respuesta a terapia. Sin embargo, aunque la respuesta fue mayor en el grupo PDL1+, este estudio pone de manifiesto que los pacientes PDL1-negativos también podrían beneficiarse del tratamiento, incluso con una mayor respuesta completa (3,4%) que los pacientes PDL1-positivos (2,7%), incluso en la terapia de tercera línea (119).

Este ensayo clínico no empleó otros marcadores, como el infiltrado de células CD8 y PD1, que pueden ser potenciales marcadores de efectividad de la terapia anti-PD1, si bien estos marcadores requieren de la obtención de una biopsia previa o de la obtención de tejido tras cirugía de resección, algo no siempre posible en todos los pacientes.

Los tumores de estómago son el cuarto tipo de tumor con más mutaciones somáticas por megabase (24). Un elevado número de mutaciones somáticas ha sido relacionado por varios autores con un aumento en el infiltrado de células T CD8 (25) y un aumento de la respuesta objetiva a inmunoterapia anti-PD1 (26).

Además, la alta expresión de PD1 se ha determinado como marcador de mal pronóstico en diversos tipos de tumores (144-147), lo que podría asemejarse a otro tipo de terapias frente a distintas dianas moleculares, como HER2, EGFR y ALK, biomarcadores con valor pronóstico que adquirieron valor predictivo para sus respectivos tratamientos específicos (trastuzumab, cetuximab y ceritinib, respectivamente) (148).

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

Este proyecto de tesis doctoral tiene como objetivo el estudio de distintos marcadores relacionados con el sistema inmunitario y la inmunoterapia en el cáncer gástrico. Para ello, se trabajó en distintos bloques experimentales.

## **1. Polimorfismos de *TGFB1* y cáncer gástrico**

Debido a la influencia de la citoquina TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo y la progresión de los tumores malignos, así como sobre el sistema inmunitario, nos planteamos la hipótesis de que los distintos polimorfismos que afectan al gen *TGFB1* y a la expresión de esta citoquina estaban relacionados con el desarrollo y la evolución del cáncer gástrico.

Para corroborar nuestra hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos:

- Analizar la frecuencia de distribución de los polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 y rs1800471 del gen *TGFB1* en pacientes con cáncer gástrico
- Relacionar estos polimorfismos con el estadio, el tipo histológico y la localización de estos tumores, así como con la supervivencia de los pacientes
- Determinar el efecto de estos polimorfismos en los niveles de expresión de la citoquina TGF- $\beta$ 1
- Analizar la expresión de TGF- $\beta$ 1 en plasma de pacientes con cáncer gástrico
- Relacionar los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 con con el estadio, el tipo histológico y la localización de estos tumores, así como con la supervivencia de los pacientes

## **2. Amplificaciones de HER2 y cáncer gástrico**

Las amplificaciones de HER2 son uno de los marcadores más importantes para el tratamiento de tumores de mama. Si bien este marcador es de igual relevancia en el cáncer gástrico, los métodos

actuales para la detección de amplificaciones del gen *HER2* siguen presentando casos equívocos, fruto de la subjetividad implícita de las técnicas (FISH e Inmunohistoquímica). Por ello, nuestra hipótesis de partida fue que las técnicas basadas en biología molecular permitirían la detección de amplificaciones de *HER2* en el ADN de pacientes con cáncer gástrico tras su optimización.

Para contrastar esta hipótesis nuestros objetivos fueron:

- Comprobar la funcionalidad de las técnicas PCR diferencial y PCR cuantitativa en muestras pareadas (tumor/distal) de pacientes con cáncer gástrico
- Establecer un punto de corte para la determinación de pacientes con amplificaciones de *HER2* en base a los datos obtenidos de una cohorte de donantes sanos
- Determinar la concordancia de ambas técnicas entre sí y con la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína *HER2* en cortes histológicos.

### **3. Fenotipado de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo y técnicas de inmunohistoquímica en cáncer gástrico**

Actualmente, la inmunoterapia basada en el bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario es una de las puntas de lanza para el tratamiento de tumores agresivos. Sin embargo, pese a la aprobación de algunos de estos fármacos, aun no hay datos suficientes que apoyen el uso de este tipo de terapias como primera línea para el tratamiento de pacientes con cáncer gástrico, ni biomarcadores específicos (especialmente en sangre periférica) que identifiquen aquellos pacientes más susceptibles de recibir inmunoterapia. Nuestra hipótesis de partida fue que los pacientes con cáncer gástrico podían beneficiarse de la inmunoterapia con bloqueadores de PD1, debido a la presencia de infiltrados de linfocitos T CD8, PD1 y una elevada frecuencia de pacientes que expresan PDL1.

Comprobamos la veracidad de esta hipótesis con los siguientes objetivos:

- Analizar por citometría de flujo las poblaciones linfocitarias de sangre periférica y tejido de pacientes con adenocarcinoma gástrico y la expresión del marcador PD1 en las mismas
- Analizar el infiltrado linfocitario mediante cortes histológicos en tejido tumoral y distal de pacientes con cáncer gástrico
- Determinar la proporción de pacientes con adenocarcinoma gástrico que expresan el marcador PDL1 en tejido tumoral y distal y el efecto de este marcador sobre las poblaciones linfocitarias analizadas
- Correlacionar los datos de sangre periférica con tejido para determinar la utilidad de los marcajes en sangre periférica como biomarcador no invasivo de pacientes en disposición de recibir inmunoterapia

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1. MUESTRAS**

### **1.1. Pacientes**

Durante la realización de este proyecto de tesis doctoral se emplearon muestras procedentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico, en colaboración con el Hospital Universitario Príncipe de Asturias, así como muestras procedentes de donantes sanos. En este apartado se detallarán las muestras disponibles, desde su llegada al laboratorio.

Los pacientes fueron catalogados en función de la etapa de desarrollo de la enfermedad según los estadios TNM (estadios I, II, III y IV), la localización de sus tumores (fondo, cardias, cuerpo y antro) y su tipo histológico (intestinal, difuso e indiferenciado). Todas las muestras llegaron al Departamento de Inmunología en medio salino y anonimizadas bajo un código interno del laboratorio.

Las muestras de pacientes consistieron en tejido (tumoral y distal) y sangre, ambos obtenidos el día en el que el paciente se sometió a la resección gástrica y previa al comienzo del tratamiento de los pacientes. Aunque las cohortes empleadas en los distintos apartados del proyecto variaron en función de la disponibilidad de muestras, de forma general los pacientes incluidos en el estudio fueron varones y mujeres de entre 37 y 89 años.

### **1.2. Tejidos**

Tras la recepción de las muestras en el Departamento de Inmunología de la Universidad Complutense, los tejidos tumor y distal fueron separados para la obtención de muestras empleadas para distintos procedimientos experimentales

#### **1.2.1. Inclusión y congelación de bloques para inmunohistoquímica**

Parte de los tejidos fueron procesados para su congelación en bloques y la obtención de cortes histoógicos. Las muestras fueron lavadas

en PBS hasta eliminar la mucosidad del epitelio gástrico, que puede interferir con los procesos de tinción por anticuerpos.

Debido al tamaño de las muestras, se prepararon casetes para cada uno de los tejidos a partir de papel de aluminio, que se llenaron con medio de congelación Tissue-Tek OCT Compound (Sakura). Tras el lavado, se introdujeron los tejidos en el interior de los casetes con medio de congelación, manteniendo la misma orientación, con el epitelio apuntando hacia el fondo del casete. Se mantuvieron las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente, dejando penetrar el medio de congelación, para posteriormente ser trasladadas a un arcón de -80°C hasta su completa congelación.

Se obtuvieron muestras de 36 pacientes, tanto de tejido tumoral como distal, lo que hacen un total de 72 bloques de tejido, que fueron almacenados en un arcon de -80°C hasta su posterior utilización.

#### **1.2.2. Cultivo de explantes de tejido para la obtención de células linfoides**

Parte de los tejidos frescos se emplearon para la obtención de células linfoides infiltrantes.

Los tejidos (tumoral y distal) fueron cortados en fragmentos de un tamaño aproximado de 2 mm de diámetro, denominados explantes, y se distribuyeron en el fondo de una placa de cultivos de 6 pocillos de fondo plano. Se añadió medio de cultivo, preparado con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, IL-2 a 500 U/mL y penicilina/estreptomicina al 1% (máximo 1 mL de medio por cada pocillo), sin cubrir los explantes, permitiendo así su adherencia al plástico. Tras 24 horas en cultivo (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, condiciones estándar), se observaron los explantes para excluir aquellos que presentaran contaminación y se añadió medio fresco hasta cubrir los fragmentos de tejido. Los siguientes cambios de medio se llevaron a cabo extrayendo los sobrenadantes del cultivo, que se centrifugaron en tubos de 15 mL a 1500 rpm 5 minutos. Tras decantar el medio, el *pellet* procedente de los sobrenadantes se resuspendió en el mismo medio fresco empleado para el cultivo inicial de los explantes, y se distribuyó de nuevo sobre los explantes en cultivo, en un volumen aproximado de 1 mL por pocillo.



Este proceso se repitió cada 2 días, manteniendo las células en cultivo un mínimo de dos semanas y un máximo de 4, hasta que se obtuvieran células suficientes para realizar el fenotipado de las poblaciones linfoides mediante citometría de flujo.

Este proceso experimental fue empleado por primera vez en nuestro laboratorio, lo que supuso un trabajo de optimización y puesta a punto que limitó la obtención de un gran número de muestras. Finalmente, se obtuvieron linfocitos de 20 tejidos tumorales y 16 tejidos distales de pacientes.

El procedimiento para la obtención de linfocitos a partir del cultivo de explantes de tejido está esquematizado en la figura 7.

### **1.2.3. Preparación de muestras para extracción de ADN**

Por último, un fragmento pequeño de tejido se empleó para la obtención de ADN procedente de tejido tumoral y distal de los pacientes.

Los fragmentos se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se mantuvieron almacenadas hasta su procesamiento. Para la obtención de ADN genómico de tejido, se empleó el kit Nucleon BACC (GE Healthcare), que permite el aislamiento de ADN a partir de muestras de tejido y de sangre. En lo que respecta al tejido, requiere un procesamiento previo que difiere del empleado en sangre periférica.

Los fragmentos congelados se sometieron a disgregación mecánica, para la cual se empleó nitrógeno líquido y un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem, hasta conseguir un polvo fino a partir de un tejido de unos 25 mg. Los tejidos homogeneizados se resuspendieron en 350  $\mu\text{L}$  el Reactivo B del kit previamente mencionado y se fueron incubados con 18  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Thermo Scientific) durante 16 horas a  $55^{\circ}\text{C}$ .

Tras este paso, las muestras están preparadas para la extracción de ADN empleando el resto del kit, que será descrita en su apartado correspondiente.

### **1.3. Sangre**

De cada paciente se obtuvieron de uno a dos tubos de sangre en EDTA, que se emplearon para la obtención de distintas muestras.

#### **1.3.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

En tubos de 15 mL, se diluyó la sangre total con tampón fosfato salino (PBS) en proporción 1:1, y esta mezcla se depositó, sin romper la interfase, sobre la mitad de volumen de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), que permite la separación de células por gradiente de densidad. Sin dejar que se mezclaran las dos fases (sangre diluida y Ficoll-Paque Plus), se centrifugaron los tubos (centrífuga Eppendorf 5810 R) a 400 g durante 40 minutos, sin aceleración ni freno, a 22 °C. Tras esto, se pudo observar la separación de las células mononucleares en una banda clara en la interfase entre el Ficoll-Paque plus y el plasma, que fue recogida y lavada dos veces (PBS 1500 rpm 5 min). Tras los lavados, las células se dejaron en medio R10 (RPMI suplementado con FBS al 10%) hasta su utilización, o bien se congelaron en medio de congelación (FBS con DMSO al 10%) en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Scientific) a -80°C durante, al menos, 24 horas, hasta su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido.

#### **1.3.2. Obtención de plasma**

Los tubos de sangre, previamente al aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, se dejaron reposar en posición vertical a 4°C hasta la separación por precipitación del plasma del resto de la fracción celular. Se recogió la fase superior (plasma) en un tubo de 2 mL y se centrifugó (microcentrífuga Eppendorf 5418 R) a 2000 g durante 10 minutos a 4°C, eliminando los restos celulares presentes en la fracción de plasma. El sobrenadante (plasma) fue recogido en un tubo limpio de 2 mL y la fracción no utilizada inmediatamente fue alicuotada y congelada a -80°C.

#### **1.3.3. Preparación de sangre para extracción de ADN**

De manera similar al procedimiento empleado en tejido, las muestras de sangre requieren de un procesamiento previo a la extracción de ADN genómico. Empleando el reactivo A, específicos para la obtención de ADN de sangre periférica, del kit Nucleon BACC (GE Healthcare) previamente mencionado, hasta 1 mL de sangre fue empleado para la obtención de ADN genómico. Tras

5 minutos de lisado de eritrocitos a temperatura ambiente y en agitación, los tubos de 15 mL que contenían la mezcla de sangre y reactivo A fueron sometidos a centrifugación a 1300 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 350 µL de reactivo B.

Tras esto, las muestras quedaban preparadas, al igual que las de tejido, para el aislamiento de ADN genómico, empleando el resto del procedimiento, descrito en su apartado correspondiente.

## **2. MÉTODOS HISTOLOGÍA – INMUNOHISTOQUÍMICA**

Los bloques de tejido previamente almacenados a -80°C se emplearon para la detección por técnicas de histología e inmunohistoquímica de distintos marcadores celulares. El estudio de los marcadores fue común para los distintos marcadores analizados, variando únicamente los tiempos de revelado de las tinciones y la concentración de los anticuerpos primarios cuando así fuera necesario.

### **2.1. Obtención de cortes de tejido**

Los bloques de tejido congelado fueron atemperados a -20°C durante la noche previa a la obtención de los cortes histológicos.

Para la obtención de los cortes histológicos, se empleó un micrótopo criostato rotativo Leica CM1950 (Leica Biosystems). Se obtuvieron cortes consecutivos de 7 µm de grosor. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos de vidrio Superfrost Plus (Thermo Scientific) , se dejaron secar al aire, etiquetaron y, aquellos que no se emplearan el mismo día, fueron almacenados en cajas con gel de sílice (para evitar la hidratación de los cortes durante el proceso de congelación y descongelación) a -80°C. Dependiendo del tamaño de los cortes, se emplearon de 3 a 4 cortes consecutivos por porta, para con ello analizar las mismas regiones durante la cuantificación.

### **2.2. Marcaje de cortes histológicos con anticuerpos**

Los cortes obtenidos previamente se rodearon con una solución hidrofóbica, de tal manera que cada corte podía teñirse de manera independiente dentro del mismo portaobjetos. Los tejidos fueron fijados

con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el proceso de fijado, los tejidos se lavaron dos veces en PBS durante 5 minutos. Para eliminar la señal producida por la enzima peroxidasa endógena de los tejidos, se empleó el reactivo BLOXALL (Vector Laboratories) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y lavando los tejidos durante 5 minutos con PBS tras el proceso de bloqueo.

Se empleó el kit de tinción inmunohistoquímica ImmPRESS Polymer Detection Kit (Vector Laboratories) durante todo el proceso de tinción, que incluía suero de caballo al 2,5% y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a una cola polimérica de HRP. A partir de este punto, todos los procedimientos se realizaron en una cámara húmeda, con el objetivo de evitar la deshidratación de los cortes.

Para bloquear la unión inespecífica de inmunoglobulinas en los tejidos, se empleó suero de caballo al 2,5% durante una hora a temperatura ambiente. Retirando la solución de bloqueo (sin paso de lavado), los cortes se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluidos en suero de caballo al 2,5%. Los anticuerpos empleados y su dilución fueron: TGF- $\beta$ 1 (clon TB21, Bio-Rad) a 5  $\mu$ g/mL, HER2 (clon 3B5, abcam) 5  $\mu$ g/mL, CD8 (clon 4B11, Bio-Rad) 5  $\mu$ g/mL, PD1 (clon J116, Novus Biologicals) 5  $\mu$ g/mL y PDL1 (clon B7-H1, Biolegend) 10  $\mu$ g/mL, así como con inmunoglobulina inespecífica de ratón 5  $\mu$ g/mL a modo de control negativo. Los tejidos se incubaron durante al menos 16 horas (overnight) a 4°C en el interior de la cámara húmeda.

Tras la incubación del anticuerpo primario, los cortes se lavaron tres veces con PBS durante 5 minutos, con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido a sus respectivos antígenos. Tras el lavado, los cortes fueron incubados con sus respectivos anticuerpos del kit ImmPRESS-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente.

Todos los anticuerpos empleados para las tinciones de inmunohistoquímica vienen recogidos en la tabla X.

### **2.3. Revelado de peroxidasa y montaje de los cortes**

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los cortes fueron lavados tres veces en PBS durante 5 minutos, eliminando el exceso de anticuerpo

secundario. Para el revelado de la tinción se empleó el kit ImmPACT DAB (Vector Laboratories. Este kit consiste en dos reactivos, una solución de dilución y otra solución con diaminobencidina (DAB), que adquiere un color marrón tras la acción de la enzima HRP, conjugada al anticuerpo secundario.

Los tiempos de incubación variaron entre 1 y 5 minutos, en función del antígeno a analizar, que requería de tiempos distintos para adquirir la coloración marrón característica. Los cortes se lavaron en PBS durante 5 minutos y se aclararon en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> para eliminar las sales residuales del PBS.

Previamente al montaje de las tinciones, se realizó una contratinción empleando el reactivo VECTOR Hematoxylin QS (Vector Laboratories) con una dilución 1:5 en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, que permite observar los núcleos y la estructura del tejido sin enmascarar la tinción de inmunohistoquímica.. Para la cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas (mostradas en las figuras 18, 19, 20 y 21), se omitió la contratinción (que puede interferir con la señal de HRP) para su correcta cuantificación empleando el software ImageJ.

Para el montaje de las muestras, se empleó el medio VECTASHIELD Vibrance (Vector Laboratories), dejándolo endurecer durante un día a temperatura ambiente. Tras su montaje, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su posterior observación y cuantificación mediante microscopía óptica.

#### **2.4. Toma de imágenes y análisis de las tinciones**

Las muestras montadas se observaron al microscopio y fueron fotografiadas para el posterior análisis de las imágenes.

Se realizaron fotos de varios campos de cada una de las tinciones y para su posterior análisis y cuantificación se empleó el software FIJI (Fiji Is Just ImageJ, programa de código abierto). La cuantificación (realizada en las tinciones de CD8, PD1 y PDL1-positivas) se llevó a cabo aislando las señales de inmunohistoquímica de cada campo y relativizando el total del campo con señal positiva con respecto al tamaño total del campo, en

tanto por ciento. Los datos obtenidos en se expresaron como % de tinción positiva que ocupaba cada campo fotografiado.

El análisis de estadístico de las cuantificaciones se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 7.0, empleando los estadísticos T-test y T-test pareado, tras determinar que los datos presentaban una distribución normal.

### **3. MÉTODOS BIOLOGIA CELULAR**

#### **3.1. Citometría de flujo**

Tanto las células obtenidas de sangre periférica como a partir del cultivo de explantes de tejido fueron analizadas mediante técnicas de citometría de flujo, consistente en la tinción de marcadores de superficie con anticuerpos específicos conjugados a fluoróforos compatibles para su análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).

##### **3.1.1. Tinción de superficie**

Para el análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo, se empleó el reactivo FACS (PBS con un 5% de FBS). Las células se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de tinción y las incubaciones de anticuerpo se realizaron a 4°C durante media hora en cada paso de tinción. Los anticuerpos empleados para los distintos marcadores extracelulares fueron: anti-CD8 FITC (clon B9.11, Beckman Coulter), anti-CD45 FITC (clon 2D1, Biolegend), anti-CD3 APC (clon UCHT1, BD Pharmingen), anti-CD4 PE (clon 13B8.2, Beckman Coulter), anti-PD1 (clon J116, Novus Biologicals), anti-CD69 FITC (clon FN50, Thermo Scientific), anti-CD25 PE (clon B1.49.9, Beckman Coulter), anti-TCR  $\alpha\beta$  FITC (clon WT31, BD Biosciences), anti-TCR  $\gamma\delta$  PE (clon 5A6.E9, ThermoFisher) y anti-CD20 Alexa 647 (clon 2H7, Biolegend). La lista completa de anticuerpos, con sus respectivas diluciones, se encuentra en la tabla X.

Aunque la mayoría de los anticuerpos empleados fueron directos, el marcaje de PD1 se realizó empleando el mismo anticuerpo primario utilizado en las tinciones de inmunohistoquímica, con idea de mantener el mismo anticuerpo para ambas técnicas y comparar así los resultados obtenidos mediante ambas metodologías. Por ello, se requirió de una tinción indirecta del marcador PD1, seguida de la tinción directa cuando así fuera necesario.

- Tinción indirecta para citometría de flujo: Tras contar las células y distribuir las en una cantidad de 200.000 células por pocillo de una placa de 96 (fondo en V), las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos (velocidad y tiempo estándar empleada durante todo el proceso). Tras decantar el medio, las células fueron incubadas con FACS durante 15 minutos, con el objetivo de bloquear posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras centrifugar y decantar el bloqueo, las células se incuban con el anticuerpo primario (en nuestro caso, anti-PD1) en la dilución apropiada durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se añade medio FACS a los pocillos para lavar el exceso de anticuerpo primario, se centrifuga y decanta el sobrenadante. Para detectar el anticuerpo primario, se empleó un anticuerpo secundario conjugado a APC, incubando las células 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras lavar el anticuerpo secundario, las células se incubaron con medio FACS con IgG inespecífica de ratón al 1%, con el objetivo de saturar las regiones de unión a antígeno del anticuerpo secundario unido a PD1. Tras esto, se centrifugó la placa sin lavar el exceso de IgG inespecífica y se procedió a la tinción directa del resto de marcadores de superficie.
- Tinción directa para citometría de flujo: Para las células previamente teñidas, el medio FACS se completó con un 1% de IgG de ratón, para mantener la saturación del anticuerpo secundario. Para el resto, se empleó medio FACS corriente. De la misma forma que el en la tinción indirecta, las células fueron bloqueadas con medio FACS durante 15 minutos a 4°C y marcadas durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos primarios conjugados a los distintos fluoróforos (FITC, PE y APC) compatibles con el citómetro BD FACSCalibur.

### **3.1.2. Determinación y análisis de poblaciones linfocitarias**

Tras el proceso de tinción, las células fueron transferidas a tubos compatibles con el citómetro, y se les añadió volumen hasta un total de 500 µL por tubo.

Para su análisis, se adquirieron un mínimo de 5000 eventos en la población de linfocitos (determinada por tamaño y complejidad durante la

adquisición). Los parámetros de adquisición de cada canal se optimizaron en cada proceso de adquisición en base a células sin tinción y controles de isotipo para cada uno de los fluoróforos empleados.

Tras la adquisición de los datos, el análisis de poblaciones linfocitarias se realizó empleando el software FlowJo V10. Este programa permite la determinación de poblaciones linfocitarias y su representación en gráficas tipo DotPlot, así como en histogramas de intensidad de fluorescencia. Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el software GraphPad Prism 7.0, con los estadísticos T-test y T-test pareado.



Anticuerpo comercial)	(Casa	Especie	Clon	Dilución	Conjugado
<b>Inmunohistoquímica</b>					
anti-TGFβ1 (Bio-Rad)		ratón	TB21	5 µg/mL	Purificado
anti-HER2 (abcam)		ratón	3B5	5 µg/mL	Purificado
anti-CD8 (Bio-Rad)		ratón	4B11	5 µg/mL	Purificado
anti-PD1 (Novus Biologicals)		ratón	J116	5 µg/mL	Purificado
anti-PDL1 (Biolegend)		ratón	B7-H1	10 µg/mL	Purificado
Anti-mouse-HRP (Vector Laboratories)		caballo	Policlonal	Stock	Polímero HRP
<b>Citometría de flujo</b>					
anti-CD8 (Beckman Coulter)		ratón	B9.11	4:50	FITC
anti-CD45 (Biolegend)		ratón	2D1	1:100	FITC
anti-CD3 (BD Pharmigen)		ratón	UCHT1	1:100	APC
anti-CD4 (Beckman Coulter)		ratón	13B8.2	4:50	PE
anti-PD1 (Novus Biologicals)		ratón	J116	1:100	Purificado
anti-CD69 (Thermo Scientific)		ratón	FN50	4:50	FITC
anti-CD25 (Beckman Coulter)		ratón	B1.49.9	4:50	PE
anti-TCR αβ (BD Biosciences)		ratón	WT31	4:50	FITC
anti-TCR γδ (ThermoFisher)		ratón	5A6.E9	4:50	PE
anti-CD20 (Biolegend)		ratón	2H7	1:100	Alexa 647
anti-mouse APC (Southern Biotech)		cabra	Policlonal	1:200	APC

**Tabla 1.** Anticuerpos empleados para las tinciones de inmunohistoquímica (mitad superior) y citometría de flujo (mitad inferior).

### **3.2. Estimulación de linfocitos y expresión de citoquinas**

Determinamos los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 tras la estimulación de PBMC obtenidas de sangre periférica.

#### **3.2.1. Condiciones de estimulación**

Linfocitos obtenidos de sangre periférica se estimularon con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA, en sus siglas en inglés), que provoca la activación directa de PKC en el interior de las células, e Ionomicina (ION), que provoca la movilización de calcio al espacio citosólico, activando con ello las vías dependientes de calcio.

La estimulación se realizó con 200.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano, en medio R10, con los estímulos PMA 20 ng/ml e Ionomicina 1  $\mu$ M durante 4 horas a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>.

Este método permite la determinar la producción de citoquinas en el sobrenadante de los cultivos empleando la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

#### **3.2.2. Cuantificación de TGF- $\beta$ 1 mediante ELISA**

La cuantificación de TGF- $\beta$ 1 se llevó a cabo en los sobrenadantes de las células estimuladas y en plasma de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Tras la obtención de los sobrenadantes de las células estimuladas, cuantificamos la cantidad de TGF- $\beta$ 1 producida por las PBMC. Para este estudio, se emplearon PBMC de pacientes previamente genotipados para los polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 y rs1800471 del gen *TGFB1*, datos que se emplearían para el análisis estadístico de la expresión de TGF- $\beta$ 1 dependiente de las variables polimórficas.

La cuantificación de TGF- $\beta$ 1 se realizó empleando el kit TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (Enzo Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el proceso consistió en un primer paso de activación del TGF- $\beta$ 1 latente de los sobrenadantes a través de un tratamiento ácido con HCl 1N por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una solución neutralizante de NaOH 1,2 N con HEPES 0,5 M, y una segunda parte en la que se siguió un protocolo de

ELISA convencional. Las muestras y los estándares de concentración se cuantificaron en un lector de placas a 450 nm.

Para la cuantificación de TGF- $\beta$ 1 en plasma de los pacientes, se utilizó el mismo kit y protocolo descrito en el párrafo anterior, con la diferencia de que para la activación de TGF- $\beta$ 1 en plasma se utilizó una solución de ácido acético 2,5 N y urea 10M durante 10 minutos, que se neutralizó con NaOH 2,7 N y HEPES 1 M.

## **4. MÉTODOS BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **4.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico**

Tras el primer paso de la extracción de ADN, distinto en función de la muestra de origen (ver obtención de muestras de tejido y sangre), se prosiguió con el procedimiento de extracción común a ambos orígenes de muestra, siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante del kit.

A partir de la muestra diluida en el reactivo B del kit, se añaden 100  $\mu$ L de cloruro sódico y, tras su mezcla por inversión, se añaden 600  $\mu$ L de cloroformo para separar la muestra en dos fases, una conteniendo el ADN y otra las proteínas. Para eliminar la purificación del ADN genómico se emplea una resina especial contenida en el kit que filtra las proteínas presentes en la fase que contiene el ADN. Tras añadir la resina, y sin alterar las distintas fases acuosas, el tubo se somete a una centrifugación a 2000 rpm durante 1 minuto. La fase superior se sometió a precipitación con etanol absoluto y se lavó dos veces con etanol al 70% y centrifugaciones a 4000 g durante cinco minutos. Se dejó secar el *pellet* al aire y se resuspendió en H<sub>2</sub>O dietil pirocarbonato (DEPC), carente de enzimas degradadoras del ADN.

El ADN de donantes sanos se obtuvo empleando el kit de obtención de ADN de saliva Oragene-DNA OG-500 (DNA genotek) y su posterior purificación se realizó utilizando el reactivo PrepIT-L2P (DNA genotek), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras la obtención del ADN genómico, se determinó su concentración y grado de pureza empleando un NanoDrop One (Fisher

Scientific). Para determinar la pureza del ADN se midió la ratio de absorbancia 260 nm/280 nm (valores óptimos en torno a 1,8) y 260 nm/230 nm (valores óptimos superiores a 1,8). Las muestras originales se alicuotaron a 50 ng/μL, estandarizando la concentración inicial de todas las muestras usadas en el estudio. El ADN no empleado el mismo día de la extracción se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **4.2. Determinación de polimorfismos genéticos**

El análisis de polimorfismos genéticos del gen *TGFB1* se realizó empleando tres metodologías distintas, considerando un resultado correcto cuando coincidían al menos dos de las tres técnicas utilizadas.

##### **4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)**

Las variantes genéticas de los polimorfismos del gen *TGFB1* pueden determinarse mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica emplea una enzima de restricción sobre una cadena de ADN amplificada previamente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniendo fragmentos de distinto tamaño en función de las variantes polimórficas que afecten a dianas para enzimas de restricción.

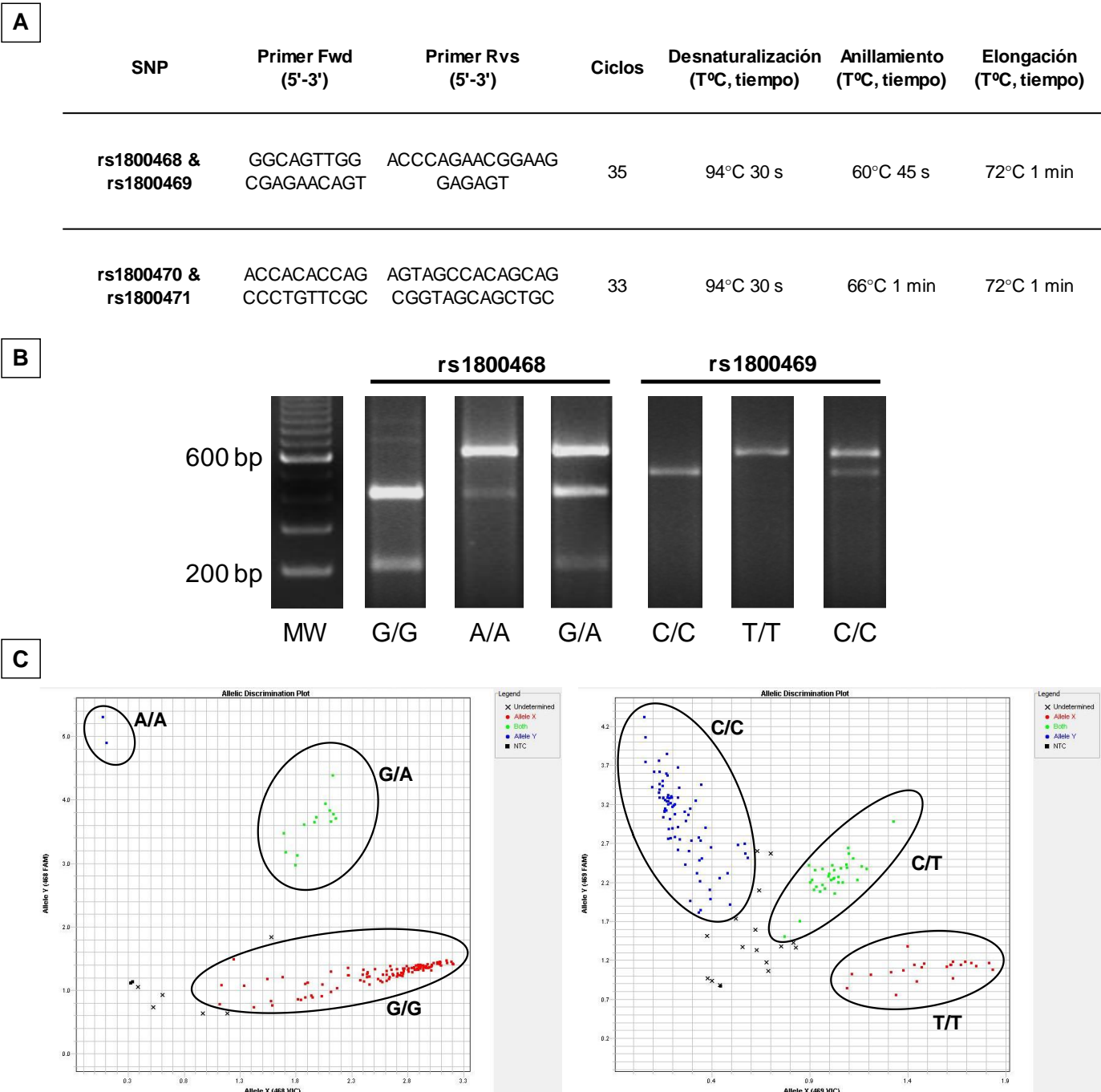
A partir del ADN extraído de las distintas fuentes (ver apartados anteriores), se realizó la amplificación mediante PCR de un fragmento de 600 pares de bases del gen *TGFB1*, que comprendía los polimorfismos rs1800468 y rs1800469. Para ello se emplearon los cebadores 5'-GGCAGTTGGCGAGAACAGT-3' y 5'-ACCCAGAACGGAAGGAGAGT-3', 500 ng de ADN y la mezcla de reacción (con polimerasa Taq) NZYTaQ II 2x Colourless Master Mix (NYZTech), hasta un volumen final de 50 μL. El programa de amplificación consistió en 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 95°C 2 segundos, 65°C 45 segundos y 72°C dos minutos, con una fase final a 72°C durante 7 minutos. Se comprobó la correcta amplificación del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, 90V 30 minutos, empleando 10 μL de producto de PCR. Tras su comprobación, el resto del producto de PCR se sometió a digestión enzimática, empleando las enzimas de restricción HpyCG4IV y Bsu36I (New England Biolabs), para los SNP rs1800468 y

rs1800469, respectivamente. La presencia de una guanina (G) en rs1800468 permitirá el corte de la enzima HpyCG4IV (diana de restricción TG|CA), generando dos fragmentos de 404 y 196 pares de bases (pb), así como la presencia de una citosina (C) en rs1800469 permitiendo a la enzima Bsu36I (diana de restricción CC|TNAGG) realizar un corte que produzca dos fragmentos de 489 y 111 pares de bases. De esta manera, se distinguieron los homocigotos G/G (404 y 196pb), C/C (600pb) y heterocigotos G/C (600, 404 y 196pb) del polimorfismo rs1800468 y los homocigotos C/C (489 y 111pb), T/T (600pb) y heterocigotos C/T (600, 489 y 111pb), resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% 90V 50 min.

La secuencia completa del amplicón, sitios de corte de las enzimas, fragmentos e imágenes de los geles resueltos pueden encontrarse en la figura 6A y B.

#### **4.2.2. Sondas TaqMan**

Como método adicional para la identificación de los polimorfismos del gen *TGFB1* se emplearon sondas Taqman y oligos específicos para cada uno de los polimorfismos (TaqMan SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems). El procedimiento consiste en la hibridación con sondas específicas para cada una de las variantes polimórficas y la posterior amplificación por PCR de la región de interés. Las sondas están marcadas con los fluoróforos VIC y FAM para cada una de las variantes del SNP. tems) para cada uno de los polimorfismos de este estudio (con los nombres C\_\_8708474\_20, C\_\_8708473\_10, C\_\_22272997\_10 y CC\_\_11464118\_30 para los polimorfismos rs1800468, rs1800469, rs1800470 y rs1800471, respectivamente). Estos ensayos vienen prediseñados por la casa comercial (Applied Biosystems)



**Figura 6.** Estrategias de genotipado de SNP del gen *TGFB1*. A) primers y ciclos y ciclos utilizados para los procedimientos de PCR-RFLP y secuenciación. B) Gel de agarosa con resultados representativos para los polimorfismos rs1800468 y rs1800469. C) Imágenes representativas del tipado de SNP mediante sondas Taqman para los polimorfismos rs1800468 y rs1800469.

Este procedimiento fue realizado en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Genómica y Proteómica de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Se empleó el equipo 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en placas de 384 pocillos en un volumen final de 5 µL, empleando los siguientes ciclos PCR: 95°C 10'; 40 ciclos de 15s a 95°C y 1' a 60°C. Los datos se analizaron con el programa SDS v2.4 (Software Detection Systems, Applied Biosystems). En la figura 6C figuran unas imágenes representativas de los resultados obtenidos mediante esta técnica.

#### **4.2.3. Secuenciación directa**

Como método de confirmación para la PCR-RFLP y la secuenciación mediante sondas TaqMan, se realizó la secuenciación directa de los polimorfismos, mediante la técnica de hibridación de sonda de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP, en sus siglas en inglés). Este procedimiento se realizó a través de un servicio de secuenciación externo.

#### **4.3. Determinación de amplificaciones genéticas**

La detección de amplificaciones genéticas del gen *HER2* se llevó a cabo con dos métodos basados en biología molecular.

##### **4.3.1. PCR diferencial (dPCR)**

Esta técnica consiste en la amplificación simultánea de dos genes en la misma reacción de PCR, con el objetivo de cuantificar el incremento en el número de copias del gen *HER2* con respecto a un gen control (*IFNG*), para el que no se han descrito amplificaciones genéticas en estos pacientes.

Para esto, empleamos dos parejas de cebadores para el gen *HER2* (denominadas *HER2 fwd/rvs* y *ErbB2 fwd/rvs*, para distinguirlas en la tabla) y una única pareja para el gen *IFNG*. Las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de sus amplicones fueron los siguientes: para el gen *HER2*, se emplearon los oligos 5'- CCTCTGACGTCCATCATCTC-3' y 5'- ATCTTCTCGTGCCGTCGCTT-3' para amplificar un fragmento de 98 pb y los oligos 5'-

AAGCATACGTGATGGCTGGT-3' y 5'- CAATCTGCATACACCAGTTC-3' para un fragmento de 180 pb, mientras que para *IFNG* se utilizó siempre la misma pareja de cebadores 5'- TCTTTTCTTTCCCGATAGGT-3' y 5'- CAGGGATGCTCTTCGACCTC-3', generando un fragmento de 150 pb. Las condiciones de PCR empleadas para ambas amplificaciones vienen descritas en la tabla 2.

Oligos	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (bp)	Ciclos	Desnat.	Anillamiento	Elongación
HER2	AAGCATACGT	180	35	94 °C	59.4 °C	70 °C
Primer Fwd	GATGGCTGGT			10 min		1 min
HER2	CAATCTGCAT	180		94 °C	1 min	70 °C
Primer Rvs	ACACCAGTTC			1 min	10 min	
ErbB2	CCTCTGACGT	98	32	94 °C	56 °C	72 °C
Primer Fwd	CCATCATCTC			10 min		1,5 min
ErbB2	ATCTTCTCGT	98		94 °C	1,5 min	72 °C
Primer Rvs	GCCGTCGCTT			1,5 min	10 min	
IFN-γ	TCTTTTCTTTC	150	Compartido con los primers HER2 y ErbB2			
Primer Fwd	CCGATAGGT					
IFN-γ	CAGGGATGCT	150				
Primer Rvs	CTTCGACCTC					

**Tabla 2.** Oligos, tamaño de los amplicones y condiciones de PCR para la determinación de amplificaciones genéticas de HER2.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3% durante, 90V 50 minutos. Se obtuvieron las imágenes resultantes y se procedió a la cuantificación de las bandas obtenidas utilizando el programa FIJI. Para estandarizar los resultados, se empleó ADN de la línea celular Caco2, que carece de amplificaciones genéticas del gen *HER2*. Por otro lado, para corroborar nuestros resultados, se emplearon como controles positivos ADN procedente de las líneas SKBR3 y BT474, ambas procedentes de tumores de mama, que sirven como control positivo de la amplificación genética de *HER2*. Imágenes representativas de ambas dPCR se encuentran en la sección de resultados.



#### 4.3.2. PCR cuantitativa en ADN genómico (qPCR)

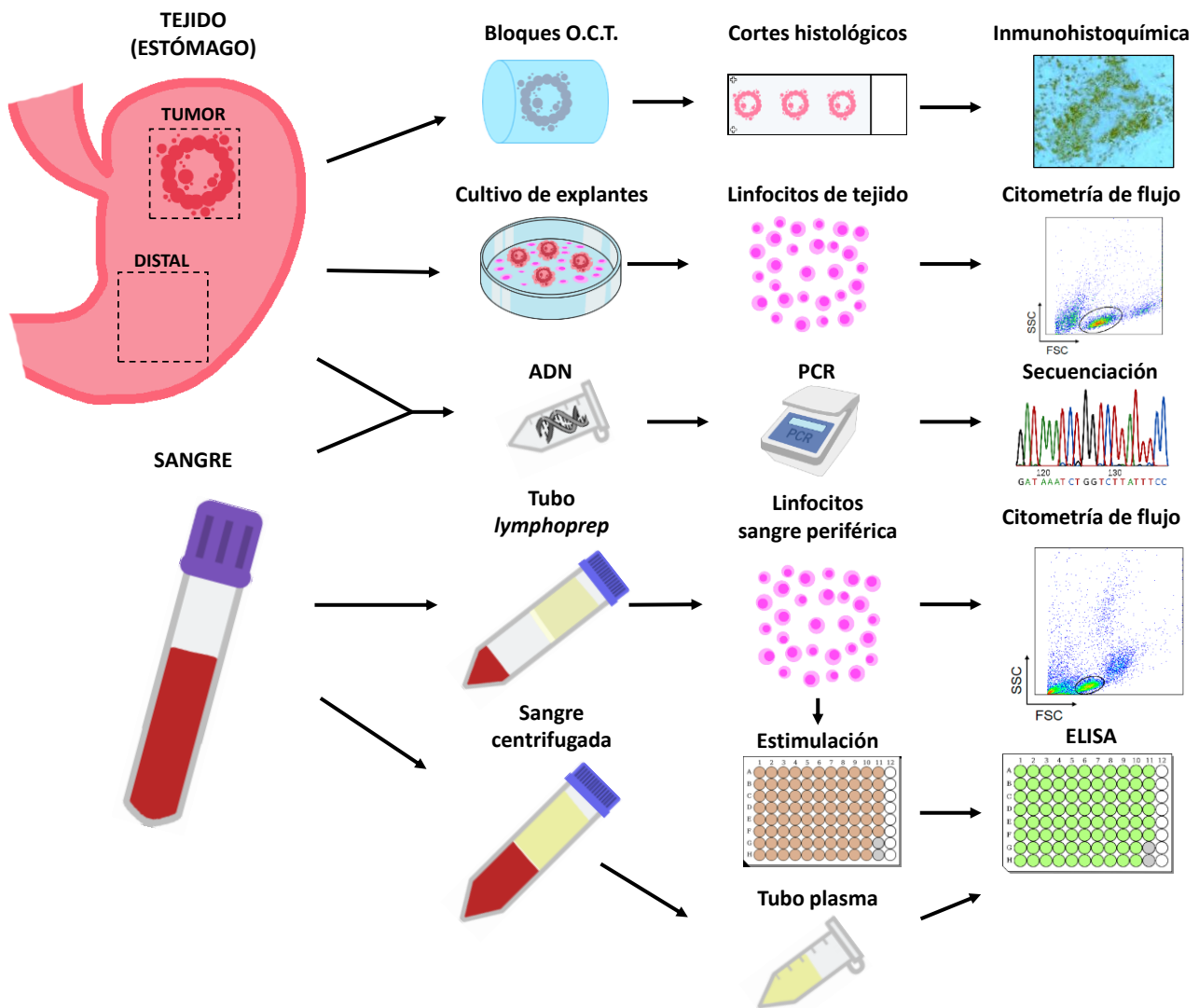
Empleando cebadores HER2 e *IFNG* y condiciones de PCR utilizados en la PCR diferencial (ver tabla X), se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) de los genes HER2 e *IFNG*. Esta técnica se basa en la cuantificación de copias de ADN mediante una qPCR convencional. Si el gen de estudio (*HER2* en nuestro caso) presenta amplificaciones genéticas, el aumento de fluorescencia en cada ciclo será varias veces mayor que el del gen control (*IFNG*). Se toma el valor. Se tomaron los valores de Cq de cada gen y se estandarizó en base a la línea Caco2, como en el caso de la dPCR. Esta aproximación se realizó de forma externa, en la empresa Secugen, donde emplearon el LightCycler 96 (Roche Life Science) con la mezcla de reacción QTM SYBR Green Supermix (Bio-rad).

La determinación de los datos de amplificación se realizó aplicando la ecuación:

$$R = (E_{HER2})^{\Delta Cq_{HER2} \text{ (control - muestra)}} / (E_{IFNG})^{\Delta Cq_{HER2} \text{ (control - muestra)}}$$

E es el valor de eficiencia de la qPCR para cada uno de los genes amplificados,  $\Delta Cq$  es la diferencia en el número de ciclos del termociclador hasta llegar a la línea umbral, y el control se corresponde con la línea Caco-2.

En la figura 7 quedan resumidos de forma gráfica los procedimientos seguidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral.



**Figura 7.** Resumen esquemático de las muestras y procedimientos experimentales seguidos durante la realización de la tesis doctoral.

# RESULTADOS

---

# 1. Polimorfismos del gen *TGFB1* y cáncer gástrico

Se emplearon dos cohortes de pacientes con adenocarcinoma gástrico, cuyas características quedan descritas en la Tabla 3.

## Patients' characteristics

		SNP analysis	Plasma TGF-β1
	Total N. (%)	78 (100)	30 (100)
Age (years)			
	Median (range)	67 (37 - 89)	65 (37-84)
Sex, N. (%)			
	Male	50 (64)	16 (53)
	Female	28 (36)	14 (47)
Stage, N. (%)			
	I	21 (27)	10 (33)
	II	18 (23)	13 (43)
	III	19 (24)	0 (0)
	IV	20 (26)	7 (23)
Treatment <sup>a</sup> , N. (%)			
	Surgery	78 (100)	30 (100)
	Chemotherapy	78 (100)	30 (100)
Overall Survival, N. (%)			
	< 5 years	57 (73)	6 (20)
	> 5 years	21 (27)	24 (80)

<sup>a</sup> Cisplatin/Oxiplatin + 5-FU + anthracycline.

**Tabla 3.** Características de los pacientes en función de la edad, el sexo, la etapa de la enfermedad, el tratamiento y la supervivencia (Juarez et al, en revisión para su publicación). Se incluyeron dos grupos de pacientes para este estudio: una primera cohorte de setenta y ocho pacientes y cincuenta y cuatro controles de sexo y edades semejantes en el análisis de SNPs del gen *TGFB1* y una segunda cohorte de treinta pacientes diferentes para medir los niveles de TGF-β1 en plasma.

Previamente al análisis de las frecuencias de cada alelo y haplotipos, determinamos y confirmamos que las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 4). Además, confirmamos que las parejas de SNP rs1800468-rs1800469, rs1800468-rs1800470, rs1800469-rs1800470,

rs1800469-rs1800471 y rs1800470-rs1800471 se encontraban en desequilibrio de ligamiento (Tabla 5)

Analizamos la distribución de los distintos polimorfismos en el grupo de pacientes, divididos en función de sus estadios TNM (tipos I, II, III y IV) y teniendo en cuenta las co-variables sexo y edad. Los resultados mostrados hacen referencia a la categorización de los pacientes en función de la ausencia (estadios I, II y III) o presencia (estadio IV) de enfermedad diseminada (ver tabla 6).

La variante rs1800468-G/A mostró una frecuencia significativamente mayor en los pacientes con metástasis (tipo IV, n=6, 30,0%) con respecto a los pacientes no metastásicos (tipos I, II y III n=6, 10,3,0%) con un OR de 3.71 IC 95%=1,03-13,40 p=0,04). No se pudieron analizar los diferentes modelos de herencia de este polimorfismo debido a la ausencia de individuos A/A en ambos grupos.

En cuanto al polimorfismo rs1800469, encontramos una ausencia total de individuos con el genotipo rs1800469-T/T en el grupo de pacientes con enfermedad diseminada, situación no observada en el caso de los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (n=11, 19,0%), así como un aumento en las frecuencias de los genotipos rs1800469-C/T (n=10, 50,0%) y rs1800469-C/C (n=10, 50,0%) en los pacientes con enfermedad diseminada, comparado con los pacientes sin enfermedad diseminada (n=22, 37,9% y n=25, 43,1%; respectivamente). Tanto el modelo codominante como el recesivo, mostraron una diferencia significativa (p=0,03 y 0,008, respectivamente) en la distribución de este SNP entre los pacientes metastásicos y no metastásicos, si bien el modelo recesivo resultó más significativo en función del p valor y el menor valor en los criterios de información bayesiano (BIC; 89,4) y de Akaike. (AIC, 98.9; datos no mostrados).

## Hardy-Weinberg equilibrium analysis

### rs1800468 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=132)

SNP Variant	G/G	G/A	A/A	G	A	P-value
Control N (%)	47 (87.1%)	6 (11.1%)	1 (1.8%)	100 (93.0%)	8 (7.0%)	0.24
Patients N (%)	66 (84.6%)	12 (15.4%)	0 (0.0%)	144 (92.0%)	12 (8.0%)	1

### rs1800469 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=125)

SNP Variant	C/C	C/T	T/T	C	T	P-value
Control N (%)	26 (55.3%)	15 (31.9%)	6 (12.8%)	67 (71.0%)	27 (29.0%)	0.15
Patients N (%)	35 (44.9%)	32 (41.0%)	11 (14.1%)	102 (65.0%)	54 (35.0%)	0.45

### rs1800470 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=103)

SNP Variant	T/T	T/C	C/C	T	C	P-value
Control N (%)	19 (44.2%)	16 (37.2%)	8 (18.6%)	54 (63.0%)	32 (37.0%)	0.2
Patients N (%)	21 (35.0%)	27 (45.0%)	12 (20.0%)	69 (57.0%)	51 (42.0%)	0.6

### rs1800471 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=101)

SNP Variant	G/G	G/C	C/C	G	C	P-value
Control N (%)	39 (90.7%)	4 (9.3%)	0 (0.0%)	82 (95.0%)	4 (5.0%)	1
Patients N (%)	46 (79.3%)	12 (20.7%)	0 (0.0%)	104 (90.0%)	12 (10.0%)	1

**Tabla 4.** Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones de estudio. Tanto la población de controles como la de pacientes se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, por lo que se prosiguió al análisis comparativo de las frecuencias de los polimorfismos.

## Linkage Disequilibrium analysis

Statistics	SNP	rs1800469	rs1800470	rs1800471
D'		0.998	0.998	0.988
r <sup>2</sup>	<b>rs1800468</b>	0.039	0.055	0.007
X <sup>2</sup> p-value		0.002	0.001	0.238
D'			0.958	0.998
r <sup>2</sup>	<b>rs1800469</b>		0.652	0.041
X <sup>2</sup> p-value			0.000	0.006
D'				0.825
r <sup>2</sup>	<b>rs1800470</b>			0.087
X <sup>2</sup> p-value				0.000

**Tabla 5.** Análisis del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos estudiados. Se determinó que los polimorfismos incluidos en este estudio se encontraban en desequilibrio de ligamiento (atendiendo a sus valores de D' y r<sup>2</sup>). Con estos datos, se procedió al estudio de haplotipos extendidos formados por todas las variantes.

## 1.1. Relación de alelos y desarrollo de cáncer gástrico

### 1.1.1. Susceptibilidad al cáncer gástrico

Si bien la frecuencia de los polimorfismos rs1800468, rs1800469 y rs1800470 no eran significativamente distintas entre los pacientes con cáncer gástrico y los controles, la frecuencia del polimorfismo rs1800471-G/C presentaba un aumento significativo en pacientes con cáncer gástrico (n=12, 20,7%) frente al grupo control (n=8; 8,4%), con un OR de 2,84 (1,12-7,22 95% CI, p=0,027) (tabla 6A). Este dato podría indicar la implicación del polimorfismo rs1800471 en la patogénesis del cáncer gástrico.

### 1.1.2. Asociación de los polimorfismos del *TGFB1* a la ausencia (estadio I, II y III) o presencia (estadio IV) de metástasis en pacientes con adenocarcinoma gástrico

El resto de los polimorfismos no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de sus alelos entre grupos de pacientes.

A)			Controls (1000 Genomes)		Gastric cancer patients		OR	95% CI	P
	Inheritance Model	Genot.	n	%	n	%			
rs1800471	N/A <sup>a</sup>	G/G	98	91.6%	46	79.3%	1	1	0.027
		G/C	8	8.4%	12	20.7%	2.84	(1.12-7.22)	
B)			Non-Disseminated Disease		Disseminated Disease		OR	95% CI	P
	Inheritance Model	Genot.	n	%	n	%			
rs1800468	N/A <sup>a</sup>	G/G	52	89.7%	14	70.0%	1	-	0.048
		G/A	6	10.3%	6	30.0%	3.71	(1.03-13.40)	
rs1800469	Codominant	C/C	25	43.1%	10	50.0%	1	-	0.03
		C/T	22	37.9%	10	50.0%	1.15	(0.40-3.32)	
		T/T	11	19.0%	0	0.0%	0	(0.00-NA)	
	Recessive	C/C-C/T	47	81.0%	20	50.0%	1	-	0.008
		T/T	11	19.0%	0	0.0%	0	(0.00-NA)	
	Dominant	C/C	25	43.1%	10	50.0%	1	-	0.62
		C/T-T/T	33	56.9%	10	50.0%	0.77	(0.27-2.16)	
rs1800470	Codominant	T/T	17	37.0%	4	28.6%	1	-	0.57
		T/C	19	41.3%	8	57.1%	1.79	(0.45-7.05)	
		C/C	10	21.7%	2	14.3%	0.85	(0.13-5.61)	
	Dominant	T/T	17	37.0%	4	28.6%	1	-	0.56
		T/C-C/C	29	63.0%	10	71.4%	1.47	(0.39-5.50)	
	Recessive	T/T-T/C	36	78.3%	12	85.7%	1	-	0.52
		C/C	10	21.7%	2	14.3%	0.59	(0.11-3.14)	
rs1800471	N/A <sup>a</sup>	G/G	37	84.1%	9	64.3%	1	-	0.12
		G/C	7	15.9%	5	35.7%	2.99	(0.75-11.83)	

**Tabla 6.** Análisis de las frecuencias de los polimorfismos aplicando distintos modelos de herencia para cada SNP. Los SNPs rs1800468 y rs1800470, debido a la ausencia de pacientes con el segundo genotipo homocigótico A/A y C/C, respectivamente, carecen de modelos de herencia analizables.



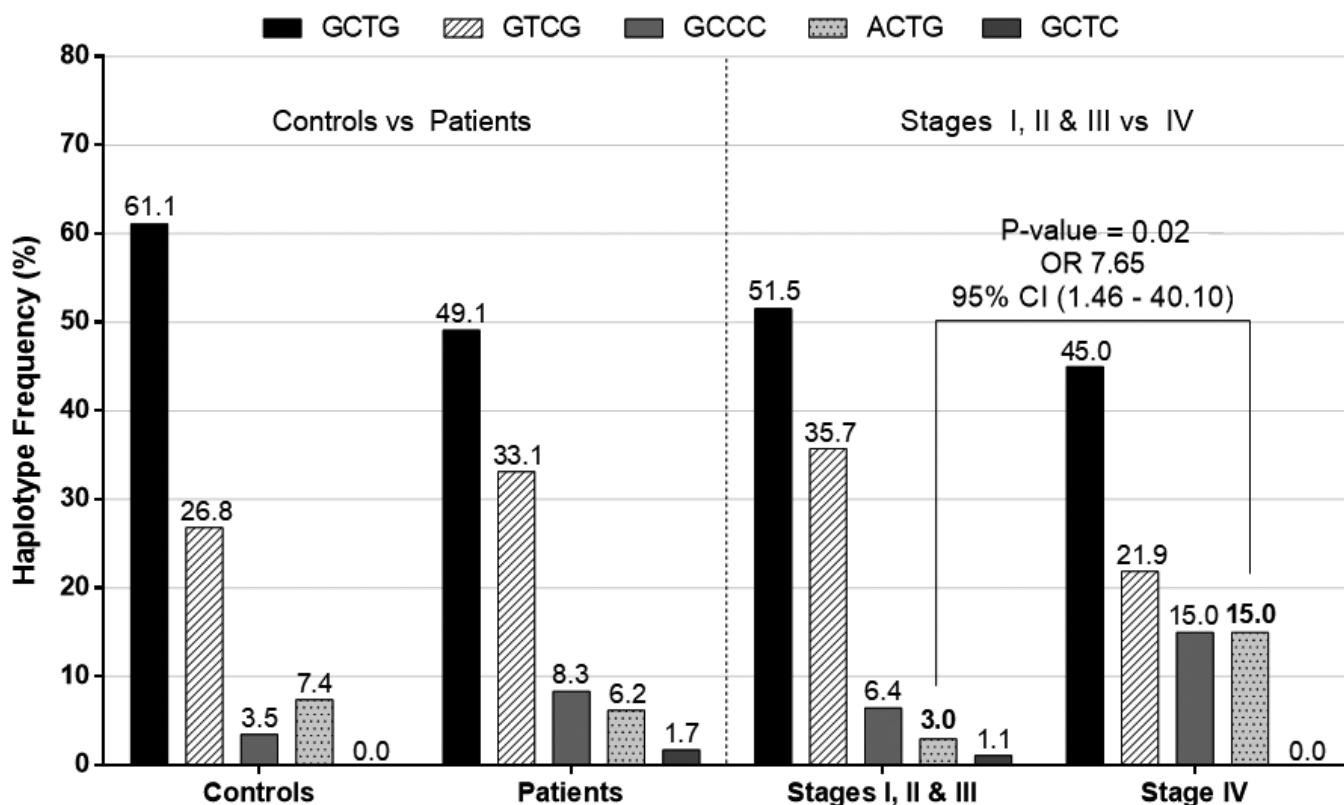
## **1.2. Relación de los haplotipos extendidos y desarrollo y evolución del cáncer gástrico**

Tras determinar que los polimorfismos estudiados se encontraban en desequilibrio de ligamiento (tabla 5), analizamos la frecuencia de los haplotipos extendidos formados por los polimorfismos del gen *TGFB1*.

No encontramos diferencias significativas en la distribución de los haplotipos extendidos entre los controles y el grupo de pacientes (figura 8).

En la comparación entre pacientes, encontramos un incremento en la frecuencia del haplotipo combinado ACTG en pacientes con enfermedad diseminada (15,0%) comparado con el resto de los pacientes (3,0%; p-valor 0,02; OR 7,65 95% IC 1,46-40.10) (figura 8), sin diferencias significativas en la distribución del resto de haplotipos extendidos.

Los datos de frecuencias alélicas del apartado anterior, así como el incremento de la frecuencia del haplotipo ACTG en pacientes con enfermedad diseminada, indicarían una relación entre los polimorfismos del gen *TGFB1* y la progresión del cáncer gástrico en nuestros pacientes.



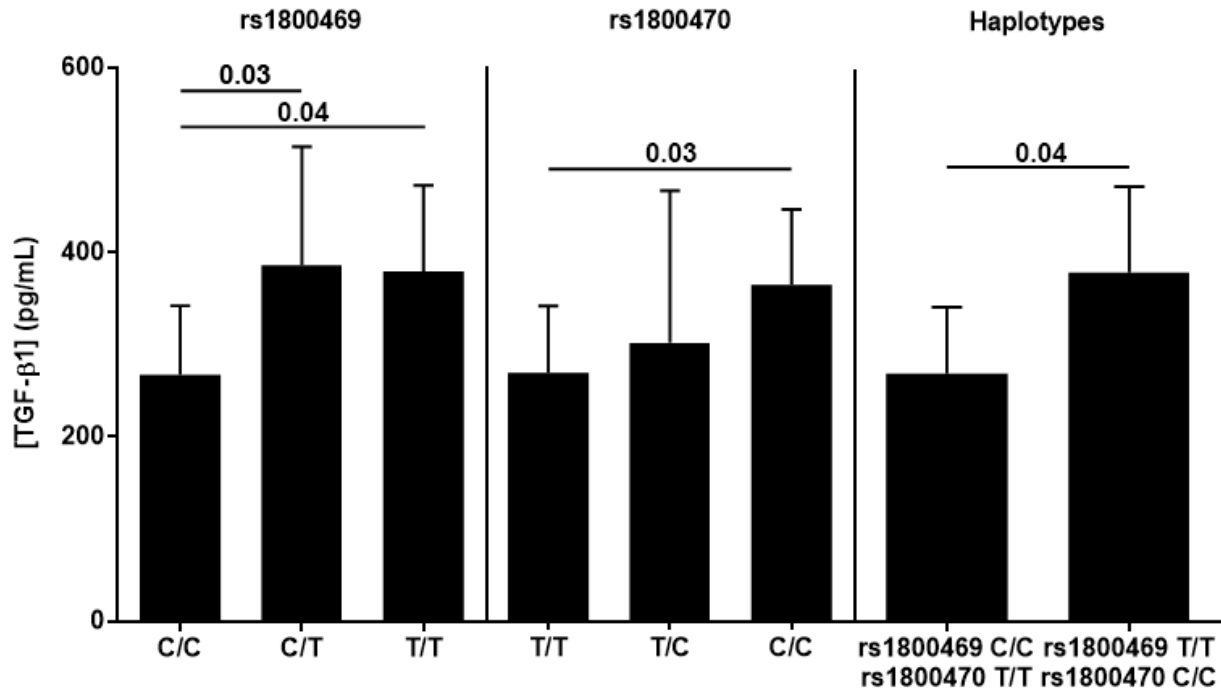
**Figura 8.** Análisis de frecuencias de los haplotipos extendidos de los SNP del gen *TGFB1*. Las muestras se agruparon en controles, pacientes y subgrupos de pacientes, según la presencia o ausencia de metástasis a distancia. De todos los estudiados, el haplotipo ACTG fue el que mostró una frecuencia incrementada en el grupo de pacientes con metástasis (15,0%) en comparación con el grupo de pacientes sin metástasis (3,0%,  $p = 0.02$ ; OR 7,65; IC 95% 1,46 – 40,10). Este haplotipo está vinculado a una menor actividad del promotor del gen *TGFB1* lo que llevaría a estos individuos a una menor expresión de la citoquina TGF- $\beta$ 1. No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de los haplotipos estudiados entre el grupo control y los pacientes.

### 1.3. Polimorfismos de *TGFB1* y expresión de TGF- $\beta$ 1

Tras los resultados que relacionaban la frecuencia de los distintos polimorfismos y haplotipos con la severidad de la enfermedad, decidimos comprobar en nuestros pacientes los datos previamente publicados que relacionan estos polimorfismos con los niveles de expresión de la citoquina TGF- $\beta$ 1. Para ello, estimulamos con PMA e Ionomicina células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes previamente genotipados, ya que los linfocitos son una de las fuentes principales de TGF- $\beta$ 1.

Encontramos una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 en PBMC de pacientes con los polimorfismos rs1800469-T/T, rs1800470-C/C y con haplotipo combinado rs180469-T/1800470-C en homocigosis (380,5 pg/mL, 365,8 pg/mL y 380,5 pg/mL, respectivamente) con respecto a los polimorfismos rs1800469-C/C, rs1800470-T/T y pacientes con el haplotipo combinado rs1800469-C/rs1800470-T en homocigosis (268,4 pg/mL T-test  $p=0,04$ ; 270,4 pg/mL T-test  $p=0,03$  y 281,6 pg/mL T-test  $p=0,04$ ; respectivamente) (figura 9). Por tanto, los polimorfismos estudiados muestran un efecto sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 producidos tras la estimulación.

Debido al bajo número de pacientes que presentaban el genotipo rs1800468-G/A y, por lo tanto, el haplotipo ACTG, decidimos utilizar únicamente los SNPs rs1800469 y rs1800470 para conformar el haplotipo de riesgo rs1800469-C/rs1800470-T (CT) para hacer las estadísticas mostradas en los siguientes apartados.

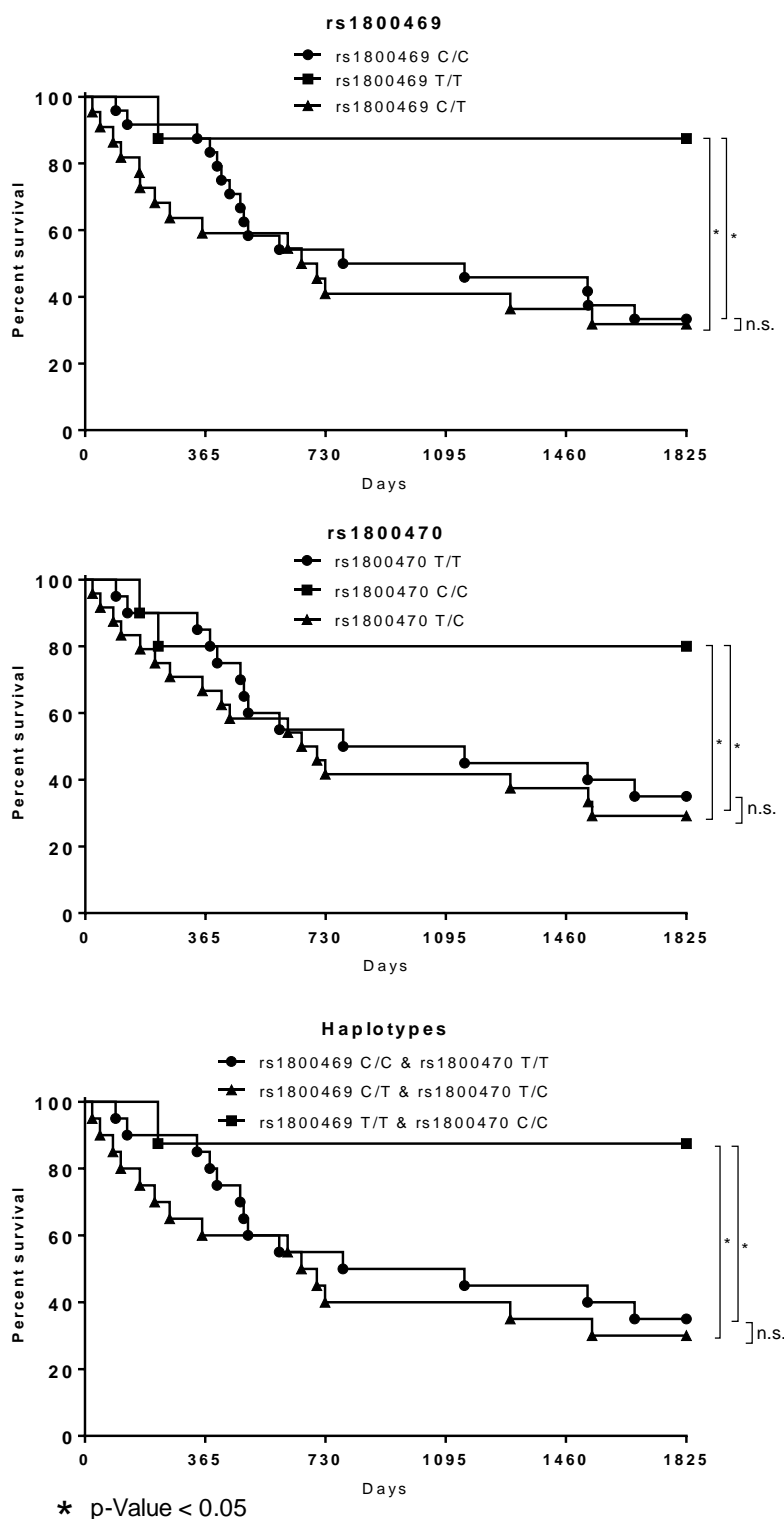


**Figura 9.** Producción de TGF-β1 en función de las variantes polimórficas del gen *TGFB1*. Las PBMC de los individuos previamente genotipados para los polimorfismos de interés fueron estimulados con PMA e ION, y la producción de TGF-β1 fue determinada mediante la técnica de ELISA. Se encontró una diferencia significativa en la producción de TGF-β1 entre los individuos rs1800469 C/C y C/T o T/T (C/C 268,4 pg/mL vs C/T 387,1 pg/mL,  $p=0,04$  o T/T 380,5 pg/mL,  $p=0,03$ ), así como entre los individuos rs1800470 T/T y C/C (T/T 270,4 pg/mL vs C/C 365,8 pg/mL T-test  $p=0,03$ ). En la comparación en función de los haplotipos, los individuos con el haplotipo rs1800469-C/rs1800470-T en homocigosis mostraron una expresión significativamente menor de TGF-β1 que los individuos con el haplotipo rs1800468-T/rs1800470-C (281,6 pg/mL vs 380,5 pg/mL, T-test  $p=0,04$ ).

#### 1.4. Polimorfismos de *TGFB1* y supervivencia de los pacientes

Para determinar el posible efecto de los polimorfismos de *TGFB1* en la supervivencia de los pacientes, decidimos utilizar los SNPs rs1800469, rs1800470 (en desequilibrio de ligamiento) y el haplotipo de riesgo rs1800468-C/rs1800470-T antes mencionado como parámetros para el análisis de supervivencia. Para este análisis sólo se consideraron los pacientes de los estadios I, II y III, con el objetivo de estudiar la esperanza de vida en pacientes con cáncer temprano o enfermedad localmente avanzada, de acuerdo con los datos publicados que sugieren que los polimorfismos del gen *TGFB1* intervienen en estadios tempranos de la patología (149, 150). Cuando se trazaron las curvas de supervivencia, la esperanza de vida a cinco años observada fue significativamente menor en los pacientes que presentaban el alelo rs1800469-C en homocigosis (28,4% Log-Rank  $p=0,02$ ) o heterocigosis (33,3% Log-Rank  $p=0,03$ ) con respecto a los pacientes rs1800469-T/T (87,5% Log-Rank  $p=0,04$ ); resultados homólogos se encontraron en pacientes con el alelo rs1800470-T en heterocigosis (32,7% Log-Rank  $p=0,04$ ) con respecto a los pacientes rs1800470-C/C (80,0%, Log-Rank  $p=0,04$ ) y en pacientes con el haplotipo de rs1800469-C/rs1800470-T en homocigosis (25,4%) o heterocigosis (35,7%) con respecto a los pacientes rs1800469-T/rs1800470-C en homocigosis (87,5% Log-Rank  $p=0,02$  en ambos casos) (figura 10).

En conclusión, los haplotipos del gen *TGFB1* estudiados identifican pacientes con menor tasa de supervivencia.



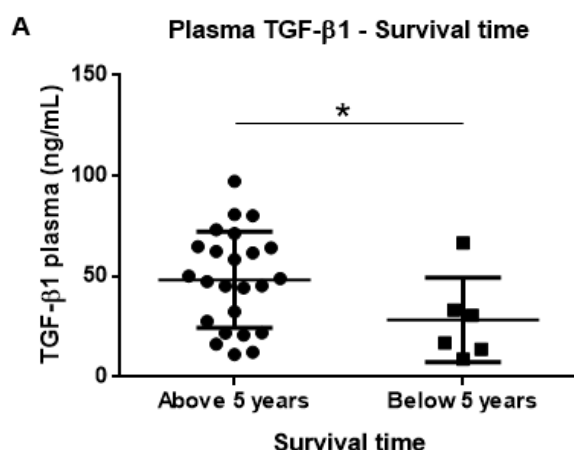
**Figura 10.** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia para la asociación entre los SNPs *TGFB1* rs1800469 y rs1800470 con el adenocarcinoma gástrico. A) Las curvas muestran una menor esperanza de vida en los individuos que con las variantes rs1800469-C/C (-■-) (28,4% Log-Rank  $p=0,03$ ) o rs1800469-C/T (-▲-) (33,3% Log-Rank  $p=0,03$ ) en comparación con los pacientes con el genotipo rs1800469-T/T (-●-) (87%) B) Los pacientes con el genotipo rs1800470-T/C (-▲-) tienen un peor valor de supervivencia (32,7% Log-Rank  $p=0,04$ ) que aquellos con el alelo rs1800470-C/C (-●-) (80,0%) C) Considerando los haplotipos combinados, los pacientes con el haplotipo rs1800469-C/rs1800470-T en homocigosis (-■-) (25,4% Log-Rank  $p=0,02$ ) o heterocigosis (-▲-) (35,7% Log-Rank  $p=0,03$ ) muestran los peores valores de supervivencia en comparación con los pacientes con el haplotipo rs1800469-T/rs1800470-C (-●-) en la homocigosis (87,5%).

El análisis de los SNP del *TGFB1* identificó a los individuos con riesgo de desarrollar cáncer gástrico, presentando una forma más agresiva de la enfermedad (estadio IV) y una menor esperanza de vida.

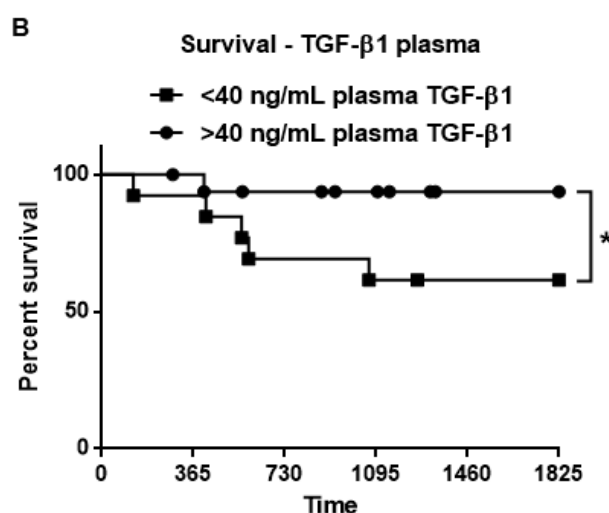
### **1.5. Niveles de TGF- $\beta$ 1 circulantes, progresión de la enfermedad y supervivencia.**

Además de medir la producción de TGF- $\beta$ 1 por PBMC de los pacientes, decidimos medir los niveles de la citoquina en el plasma de un grupo de pacientes (no genotipados) con adenocarcinoma gástrico (N=30).

Cuando se dividió a los pacientes según su estado de TNM, no se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos del TGF- $\beta$ 1 entre los pacientes con enfermedad no diseminada (tipo I y II, no se pudo reclutar pacientes en estadio III para este análisis) y los pacientes con enfermedad diseminada (tipo IV) (datos no mostrados). Sin embargo, clasificando a los pacientes según su supervivencia a 5 años, los niveles de TGF- $\beta$ 1 en plasma fueron menores en pacientes con una supervivencia inferior a 5 años (27,1 ng/mL, N=9) en comparación con los pacientes con una supervivencia superior a 5 años (49,2 ng/mL, N=36, p=0,03). Esto sugiere que, independientemente de la etapa de la enfermedad, los pacientes con niveles más bajos de TGF- $\beta$ 1 tienen una progresión más rápida y agresiva de la enfermedad (ver figura 11A). Dado que los polimorfismos del *TGFB1* no se llevaron a cabo en este grupo de pacientes, no se pudo evaluar su efecto sobre los niveles de citoquinas.



\* P-Value < 0.05



\* P-Value < 0.05

**Figura 11.** Niveles de TGF en plasma- $\beta$ 1 y tasa de supervivencia. A) Los niveles de TGF- $\beta$ 1 en plasma son más bajos en pacientes con un tiempo de supervivencia reducido: Los pacientes con un tiempo de supervivencia inferior a 5 años tienen una disminución significativa de los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 ( $28,3 \text{ ng/mL} \pm 8,6 \text{ N}=6$ ) en comparación con los pacientes por encima de ese límite ( $48,3 \text{ ng/mL} \pm 4,9 \text{ N}=24$ ,  $p=0,03$ ). B) Curvas de supervivencia de pacientes con niveles altos ( $>40 \text{ ng/mL}$ ) y bajos ( $>40 \text{ ng/mL}$ ) de TGF-  $\beta$ 1 en plasma. Los individuos con menos de  $40 \text{ ng/mL}$  (-■-) de TGF- $\beta$ 1 en plasma presentan una menor tasa de supervivencia ( $61,5\%$ ) que aquellos pacientes con niveles Superiores a este límite (-●-) ( $93,5\%$ , Log-Rank  $p=0,04$ ).

Tras los resultados explicados en el párrafo anterior, decidimos buscar un punto de corte por encima del cual pudiéramos predecir la progresión de un paciente determinado, descubriendo que los pacientes con menos de  $40 \text{ ng/mL}$  de TGF- $\beta$ 1 en plasma mostraban una tasa de supervivencia significativamente menor ( $N=13$ ,  $62\%$ ) que los pacientes con niveles por encima de este punto de corte ( $N=17$ ,  $94\%$ , Log-Rank  $p=0,04$ ) (figura 11B).

Por lo tanto, las mediciones de TGF- $\beta$ 1 plasmático ayudan a identificar a los pacientes con una esperanza de vida reducida.



## 2. Amplificaciones genéticas de *HER2* en cáncer gástrico

Se empleó la cohorte de pacientes descrita en la tabla 7.

		Patients
Median Age (range)		68.44 (38-85)
Male		16 (53,3)
Female		14 (46,7)
UICC 7th edition		
Stage I		10 (33,3)
	IA	7 (23,3)
	IB	3 (10)
Stage II		8 (26,7)
	IIA	6 (20)
	IIB	2 (6,7)
Stage III		3 (10)
Stage IV		8 (26,7)
Surgery		30 (100)
Chemotherapy* + Radiotherapy		30 (100)

\* Cisplatin/Oxaliplatin + 5-FU + anthracycline

**Tabla 7.** Datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos en el estudio.

Para la determinación de muestras positivas para la amplificación del gen *HER2*, se requirió de un proceso de estandarización y obtención de un punto de corte (cut-off) a partir de muestras de sangre periférica procedentes de donantes sanos.

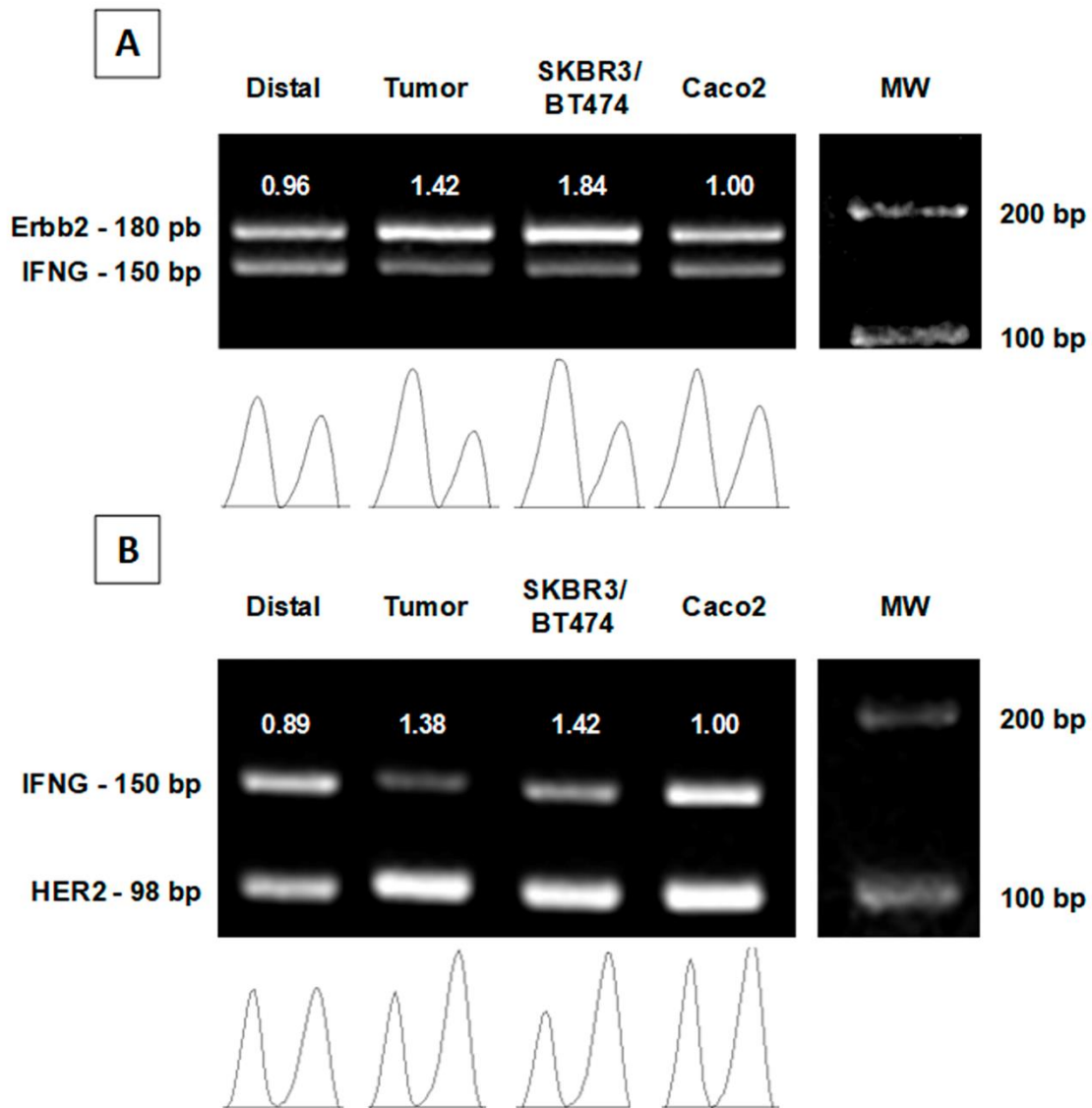
## **2.1. Determinación de punto de corte (cut-off) estandarizado de la ratio *HER2/IFNG***

Se calcularon las ratios *HER2/IFNG* de una cohorte de 30 muestras de ADN de donantes sanos. A partir de los datos obtenidos en pacientes se determinó el punto de corte a partir del cual las muestras serían consideradas como *HER2+* (con amplificación genética de *HER2*).

El punto de corte se estableció basándose en la media y desviación estándar del cociente *HER2/IFN-γ* obtenidas en el grupo de control. Para la dPCR, este punto de corte se fijó en el valor medio más dos veces la desviación estándar ( $X_{\text{control}} + 2SD_{\text{control}}$ ). En el caso de la qPCR, se utilizó tres veces la desviación estándar ( $X_{\text{control}} + 3SD_{\text{control}}$ ), que permitió aumentar el nivel de confianza (99%) sin aumentar los falsos positivos. Con este procedimiento se obtuvieron resultados coherentes al comparar ambas metodologías, como se verá en los siguientes apartados. Esta metodología está basada en artículos previamente publicados por nuestro grupo de investigación (151).

## **2.2. Análisis de amplificaciones genéticas de *HER2* mediante PCR diferencial**

Para la determinación de amplificaciones mediante PCR diferencial (dPCR), cargamos las amplificaciones simultáneas de *HER2* e *IFN-γ* en un gel de agarosa al 3%, con las muestras tumoral y distal en carriles consecutivos, así como los controles positivos (dPCR de SKBR3 y BT474) y la amplificación de Caco2 a modo de estandarización de *HER2*(-) (figura 12).



**Figura 12.** Ejemplo de dPCR por cada uno de los primers empleados. A) Primers *ErbB2* (180 pb) e *IFNG* (150 pb), B) Primers *IFNG* 150 pb) y *HER2* (98 pb). Cada PCR realizada durante los experimentos incluyó la amplificación de muestras pareadas (distal y tumor), un control positivo (ADN de SKBR3 y BT474) y el control negativo (Caco2). Los gráficos de densidad fueron cuantificados y relativizados a Caco2. Los valores debajo de las bandas corresponden con la ratio HER2/IFN- $\gamma$ .

La figura 13A muestra las proporciones HER2/IFN- $\gamma$  obtenidas tras la amplificación de muestras de ADN de 30 individuos sanos (panel superior). El punto de corte obtenido, basado en el valor medio (0,73) y la desviación estándar (0,25), fue de 1,22. Todos los valores de la proporción

antes indicados por encima de este umbral se consideraron positivos. En este caso, sólo un sujeto sano (el número 15) obtuvo una relación por encima del punto de corte.

El panel medio de la figura 13B refleja los resultados obtenidos con muestras de tejido pareadas (tumoraes y distales) del grupo de pacientes. El ADN de 8 muestras tumorales (1,77; 1,32; 1,41; 1,68; 1,25; 1,99; y 2,14; pacientes 3, 10, 11, 18, 19, 21 y 27 respectivamente) presentaron una proporción HER2/IFN- $\gamma$  por encima del punto de corte antes mencionado. Las líneas celulares positivas (BT-474 y SKBR-3), como estaba previsto, superaban el punto de corte (1,25 y 1,56 respectivamente), mientras que la ratio HER2/IFN- $\gamma$  de la línea celular negativa (Caco-2) estaba por debajo del mismo (0,96). Por último, el panel inferior de la figura 13A muestra los resultados generales obtenidos con todas las muestras: pacientes (tejido tumoral y distal), sujetos de control sanos y líneas celulares.

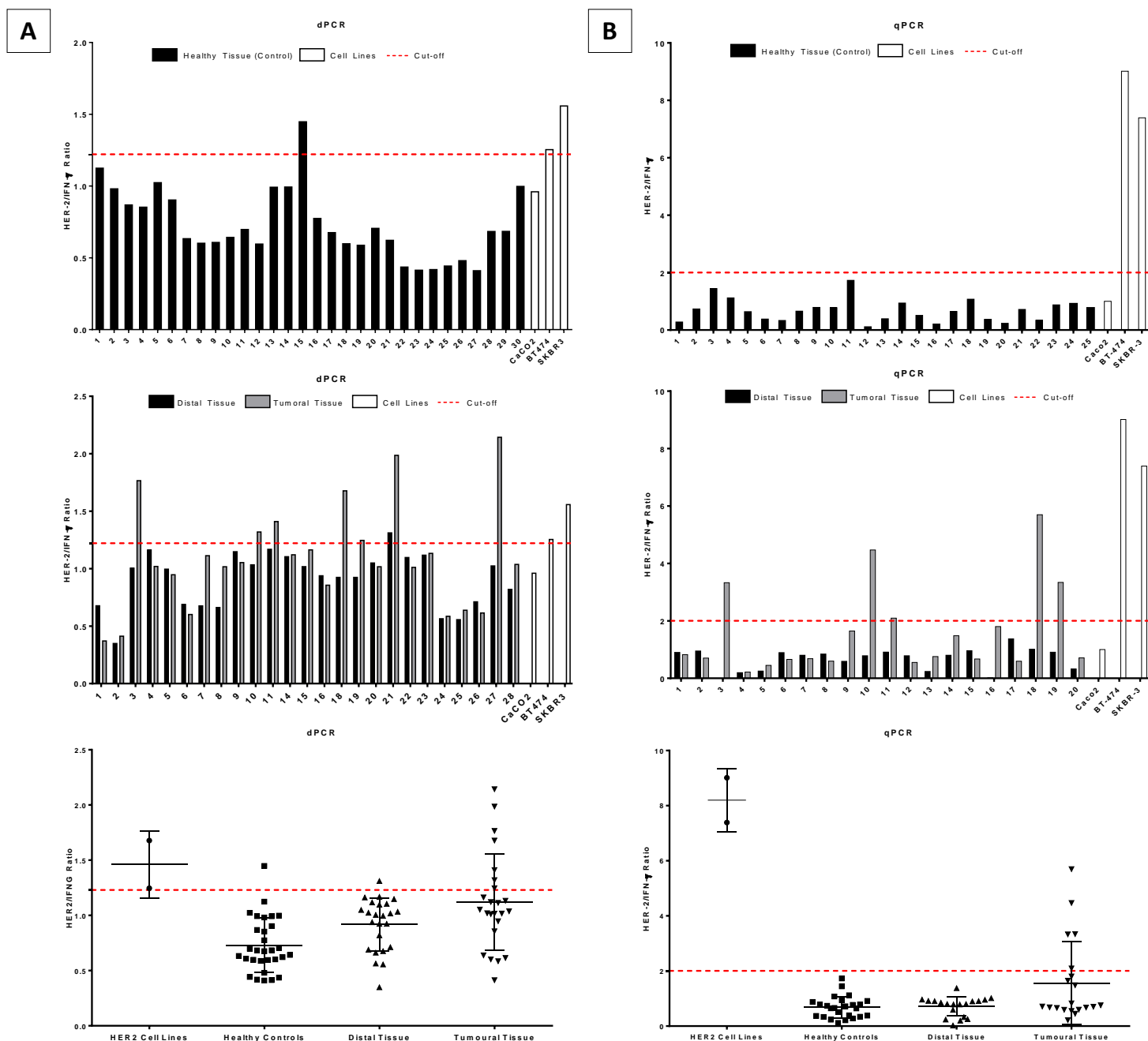
### **2.3. Análisis de amplificaciones genéticas de *HER2* mediante PCR cuantitativa**

Sometiendo las muestras de DNA a PCR cuantitativa (qPCR), se obtuvieron resultados comparables con la técnica de dPCR (figura 13B). De nuevo, el panel superior muestra las proporciones HER2/*IFNG* obtenidas al amplificar muestras de ADN de 30 individuos sanos, anteriormente analizados por la dPCR. Con esta técnica, el valor medio (0,68) y la desviación estándar (0,39) obtenidos, determinaron un punto de corte de 1,85. En esta ocasión ninguno de los controles estudiados arrojó un valor por encima del de este punto.

Cuando se considera el ADN de muestras emparejadas (tumoraes y no tumorales) de pacientes con adenocarcinoma gástrico (panel medio), algunas muestras de tejido tumoral (los mismos pacientes mencionados anteriormente, 3, 10, 11, 18 y 19, con valores 3,32; 4,47; 2,09; 5,70; y 3,34, respectivamente), y ningún tejido de la región distal mostró un valor de HER2/*IFNG* superior al valor umbral. Las líneas celulares de control se comportan como en el análisis por dPCR: BT-474 y SKBR-3 dieron resultados positivos (9,01 y 7,39 respectivamente). El panel inferior de la figura 13B muestra los resultados obtenidos con todas las muestras utilizadas.

Con las metodologías aquí propuestas, detectamos la amplificación del HER2 en siete de veintiocho (dPCR) y cinco de veinte (qPCR) pacientes estudiados (ambos casos, 25%), de acuerdo con los informes publicados que oscilan entre el 10% y el 30% dependiendo de la serie (136-140, 152).

Por tanto, esta metodología ha permitido identificar amplificaciones del gen *HER2* en muestras procedentes de pacientes con cáncer gástrico. De esta manera, hemos determinado que la presencia de amplificaciones de HER2 es exclusiva del tejido tumoral de estos pacientes y, en nuestro caso, se produce en un 25% de los individuos que desarrollan esta patología. Esta metodología pudo confirmarse mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, lo que convierte a la dPCR y qPCR en unas técnicas complementarias a tener en cuenta para la evaluación de este tipo de alteraciones genéticas.

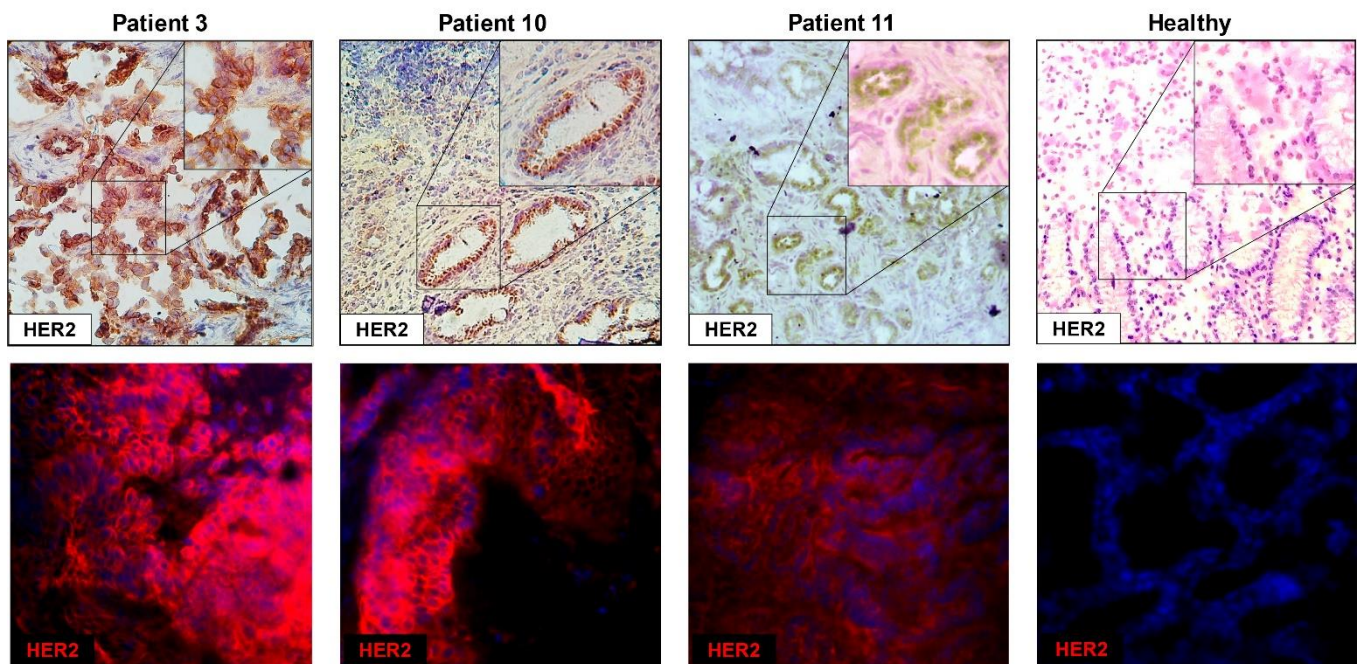


**Figura 13.** Cuantificación de las amplificaciones de HER2 por dPCR (A) y qPCR (B). Panel superior: Resultados obtenidos con muestras de controles sanos. Todas, excepto la muestra 15 en dPCR, se encuentran por debajo del punto de corte (1,22 para dPCR y 1,85 para qPCR, ver texto para descripción detallada del cálculo de puntos de corte). Medio: Resultados obtenidos con muestras pareadas (tumoraes y distales) de pacientes con cáncer gástrico. Se obtuvieron resultados consistentes en que los pacientes 3, 10, 11, 18 y 19, positivos con ambas metodologías. Inferior: Gráficas que representan los resultados obtenidos en todas las muestras: pacientes (tumoraes y distales), sujetos sanos y líneas celulares positivas.

## 2.4. Sobreexpresión de la proteína HER2 en tumores gástricos: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

La tinción de los tejidos, tanto con técnicas de IHC como empleando IF, confirma los resultados obtenidos previamente por dPCR y qPCR en las muestras analizadas, como se muestra en la figura 14.

No se encontró tinción de HER2 en el tejido distal ni las muestras de pacientes con resultados por debajo del punto de control por dPCR o qPCR.



**Figura 14.** Tinciones representativas por inmunohistoquímica (IHC, paneles superiores) e inmunofluorescencia (IF, paneles inferiores) de muestras de tejido tumoral de pacientes HER2+ por dPCR y qPCR (pacientes 3, 10 y 11, ver figura 13) y tejido distal (healthy) de pacientes con cáncer gástrico. Se confirmó la tinción positiva de HER2 en el tejido tumoral, pero no distal de los pacientes considerados HER2+ tanto por qPCR como por dPCR.

### **3. Estudio de poblaciones CD8, PD1 y expresión de PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico**

Empleamos muestras procedentes de la cohorte de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Las características de estos pacientes están descritas en la tabla 8.

#### **3.1. Fenotipado de poblaciones linfoides mediante citometría de flujo**

Se siguió esquema de tinciones y selección de poblaciones de la figura 15 para los análisis de citometría de flujo de sangre periférica y células procedentes del cultivo de explantes.

Los datos de sangre periférica indican un aumento de células PD1 positivas en linfocitos de sangre periférica (PBL) en pacientes con cáncer gástrico ( $24,9\% \pm 2,0$   $n=37$ ) comparado con controles sanos ( $15,4\% \pm 1,9$   $n=21$ , T-test  $p=0,003$ ) (figura 16).

El análisis de citometría de flujo reveló la existencia de dos poblaciones de células CD8+ en sangre periférica (ver figuras 15 y 16), denominadas CD8<sup>High</sup> y CD8<sup>Low</sup>. Algunos autores han determinado que existen diferencias funcionales entre estos grupos de células (153), por lo que evaluamos el balance entre los subtipos de células CD8+ mediante la ratio CD8<sup>High</sup>/CD8<sup>Low</sup>.

De igual manera, si bien no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de células CD8+, encontramos un descenso en la ratio CD8<sup>High</sup>/CD8<sup>Low</sup> en linfocitos de sangre periférica de los pacientes ( $3,8 \pm 0,4$   $n=35$ ) con respecto a los controles ( $5,7 \pm 0,83$   $n=19$ , T-test  $p=0,014$ ) (figura 16).

Dentro de la población CD8+ (CD8 totales), encontramos un incremento en la frecuencia de células PD1+ en pacientes (CD8+ PD1+,  $46,1\% \pm 4,3$   $n=26$ ) con respecto a los controles ( $25,1\% \pm 4,2$   $n=16$ , T-test  $p=0,002$ ).



Characteristics		N (%)
Age at diagnosis (years)		
	Median (range)	67 (39-84)
Gender		
	Male	25 (58%)
	Female	18 (42%)
Stage at diagnosis		
	Stage I	6 (18%)
	Stage II	14 (41%)
	Stage III	5 (15%)
	Stage IV	9 (26%)
	No-data	9
Treatment		
	Surgery	43 (100%)
	Chemotherapy <sup>a</sup>	43 (100%)
Location of lesion		
	Antrum	12 (36%)
	Body	15 (45%)
	Fundus	2 (6%)
	Cardia	3 (9%)
	Spreaded	3 (9%)
	No-data	10
Histology of lesions		
	Intestinal	15 (45%)
	Difuse	11 (33%)
	Undifferentiated	7 (21%)
	No-data	10

<sup>a</sup> Cisplatin/Oxaliplatin + 5-FU + anthracycline

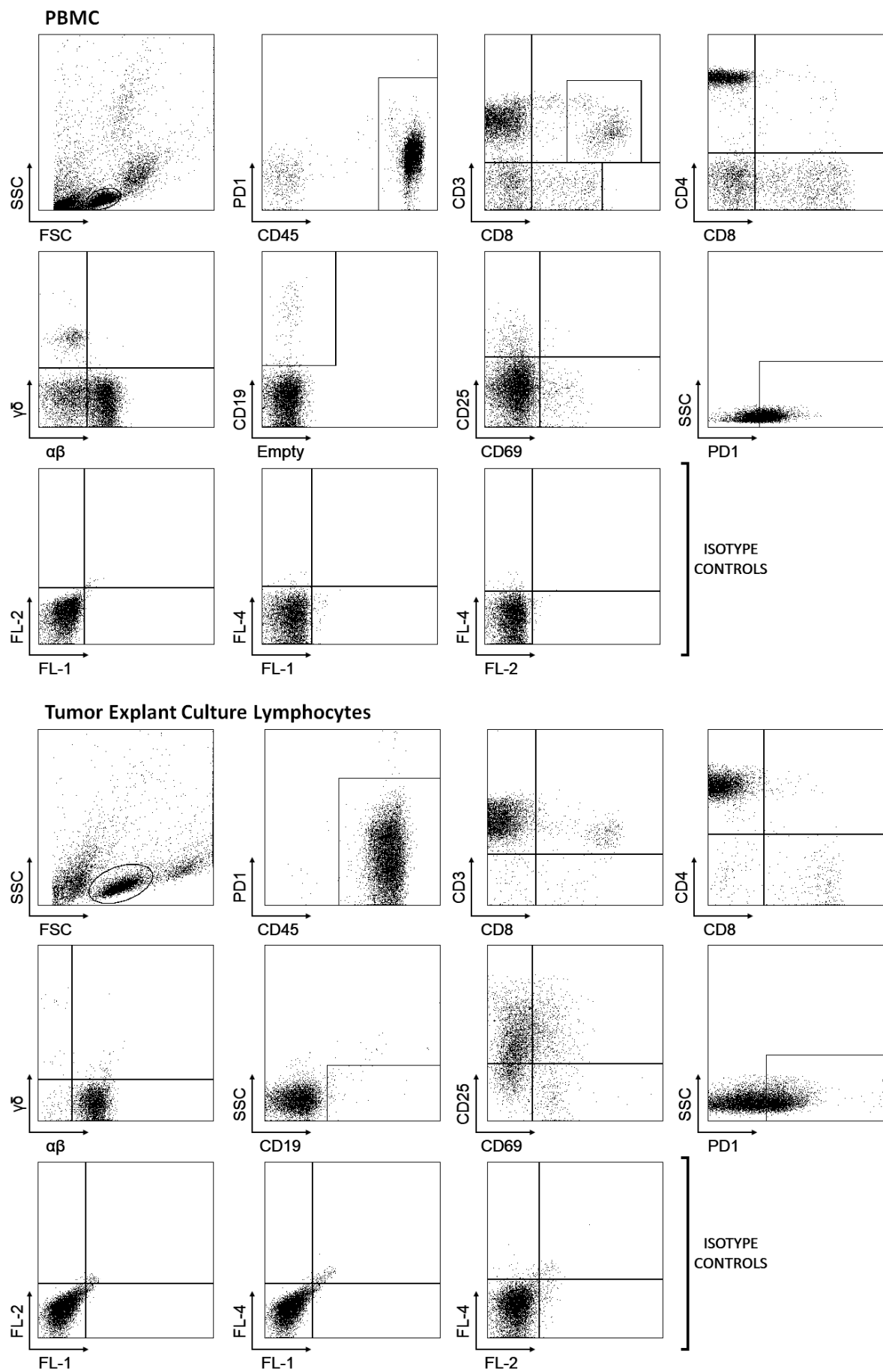
**Tabla 8.** Características de los pacientes en función de la edad, el sexo, la etapa de la enfermedad, localización de las lesiones, histología de los tumores y el tratamiento seguido por los pacientes.

También encontramos una frecuencia mayor de células CD8+PD1+ (46,1%  $\pm$  4,3 n=26) que el total de linfocitos PD1+ (PBL PD1+) (24,9%  $\pm$  2,05 n=37, T-test  $p < 0,0001$ ), lo que indica que la expresión de PD1 es mayoritaria en células CD8 de pacientes con cáncer gástrico.

Al analizar las células obtenidas del cultivo de explantes de tejidos, encontramos una menor frecuencia de células CD8 procedentes de tejido tumoral (23,2%  $\pm$  4,8 n=17) con respecto a las células CD8 obtenidas del cultivo de explantes de tejido distal (39,3%  $\pm$  5,1, n=14, T-test  $p = 0,03$ ), así como en el análisis pareado de las muestras tumoral-distal (T-test  $p = 0,04$ ). No encontramos diferencias en la frecuencia de PD1 entre células procedentes del tejido tumoral (48,7%  $\pm$  6,6 n=15) en comparación al tejido distal (53,8%  $\pm$  6,6 n=11, T-test  $p = 0,6$ ) (ver figura 16)

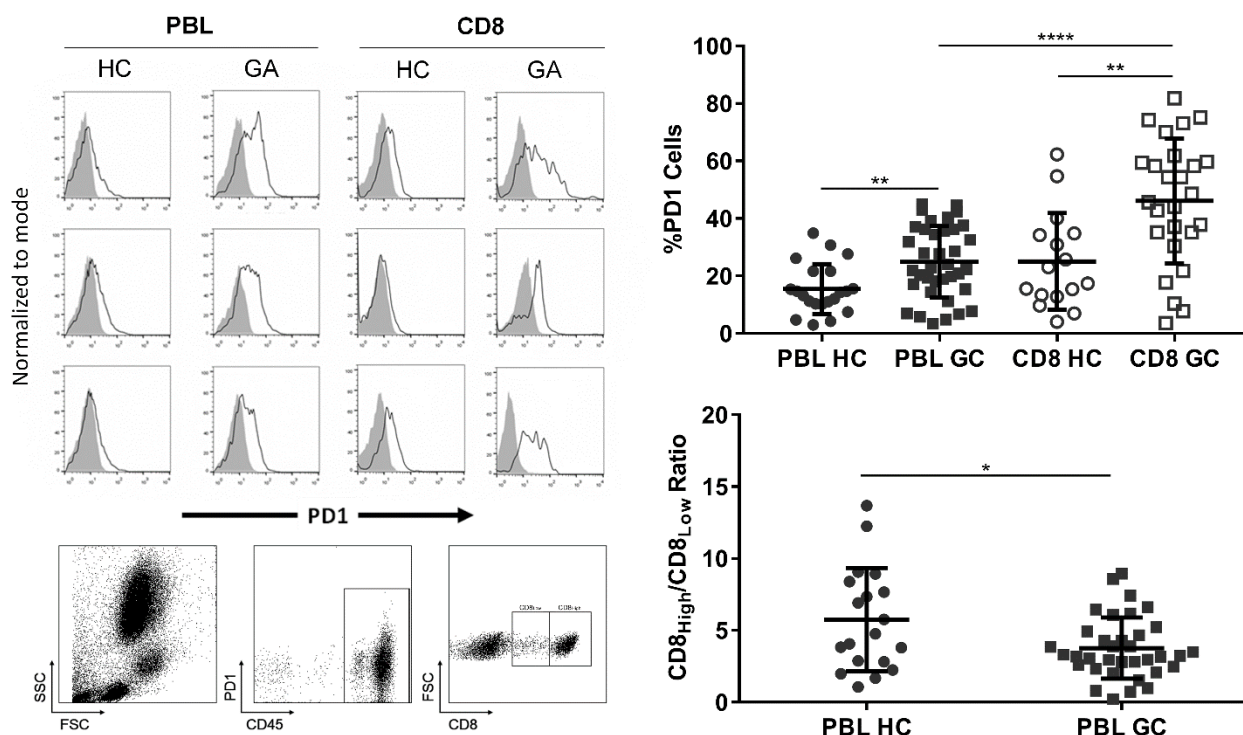
No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , CD25 o CD69 tanto sangre periférica como en el cultivo de explantes de los pacientes (datos no mostrados).

Al comparar la frecuencia de células PD1, CD8, T  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ , CD25 y CD69 en función de los estadios, edad, sexo o localización del tumor en el grupo de pacientes, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los parámetros en ninguna de las comparaciones realizadas (datos no mostrados).

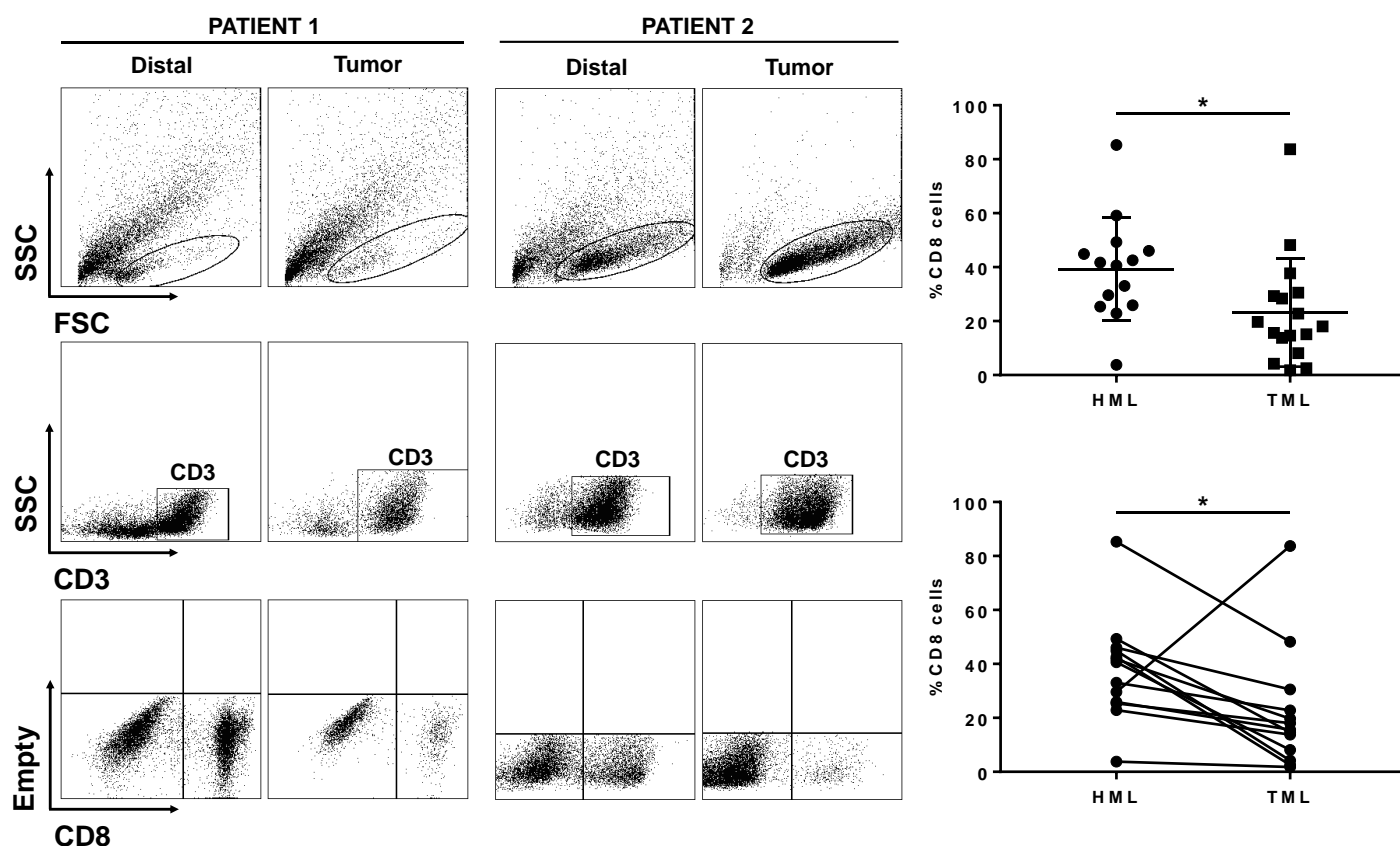


**Figura 15.** Poblaciones analizadas mediante citometría de flujo.

HC = Healthy Control  
GA = Gastric Adenocarcinoma (Patient)



**Figura 16.** Incremento de células PD1 y menor ratio CD8<sup>High</sup>/CD8<sup>Low</sup> en sangre sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico. Izquierda: Histogramas representativos de tinciones de PD1 en sangre periférica de controles sanos (HC) y pacientes con cáncer gástrico (GA), en la población de linfocitos (región de linfocitos por FSC-SSC y CD45+, PBL, histogramas a la izquierda) y linfocitos CD8 (región de linfocitos por FSC-SSC y CD8+, histogramas a la derecha). Encontramos un aumento significativo de células PD1 en PBL de pacientes con cáncer gástrico con respecto a los PBL de controles sanos y en linfocitos CD8 de pacientes con cáncer gástrico con respecto a controles sanos. Además, la frecuencia de células PD1 también resultó mayor en las células CD8 con respecto a los PBL totales. Se encontró un descenso significativo en la ratio CD8<sup>High</sup>/CD8<sup>Low</sup> en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico, con respecto al grupo de controles sanos. Se empleó el estadístico T-test y T-test pareado. Niveles de significación: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001.



**Figura 17.** Menor frecuencia, por citometría de flujo, de células CD8 en linfocitos obtenidos de cultivo de explantes de tejido distal (HML) y tumoral (TML) de pacientes con cáncer gástrico. Izquierda: DotPlots del análisis de citometría seguido para estas muestras. Tras obtener la población de linfocitos mediante tamaño y complejidad, se determinó la expresión de CD3 en superficie, y se analizó en este grupo la frecuencia de células CD8. Derecha: Análisis estadísticos significativos de las poblaciones estudiadas. Encontramos un descenso significativo en la frecuencia de células CD8 en el tejido tumoral con respecto del tejido distal, tanto en el análisis no pareado de las muestras como en el análisis pareado. No encontramos diferencia en la expresión de PDL1 entre tejido tumoral y distal de estos pacientes (datos no mostrados). Se empleó el estadístico T-test y T-test pareado.

Niveles de significación: \*  $p < 0,05$ .

### **3.2. Determinación de CD8, PD1 y PDL1 por técnicas de inmunohistoquímica**

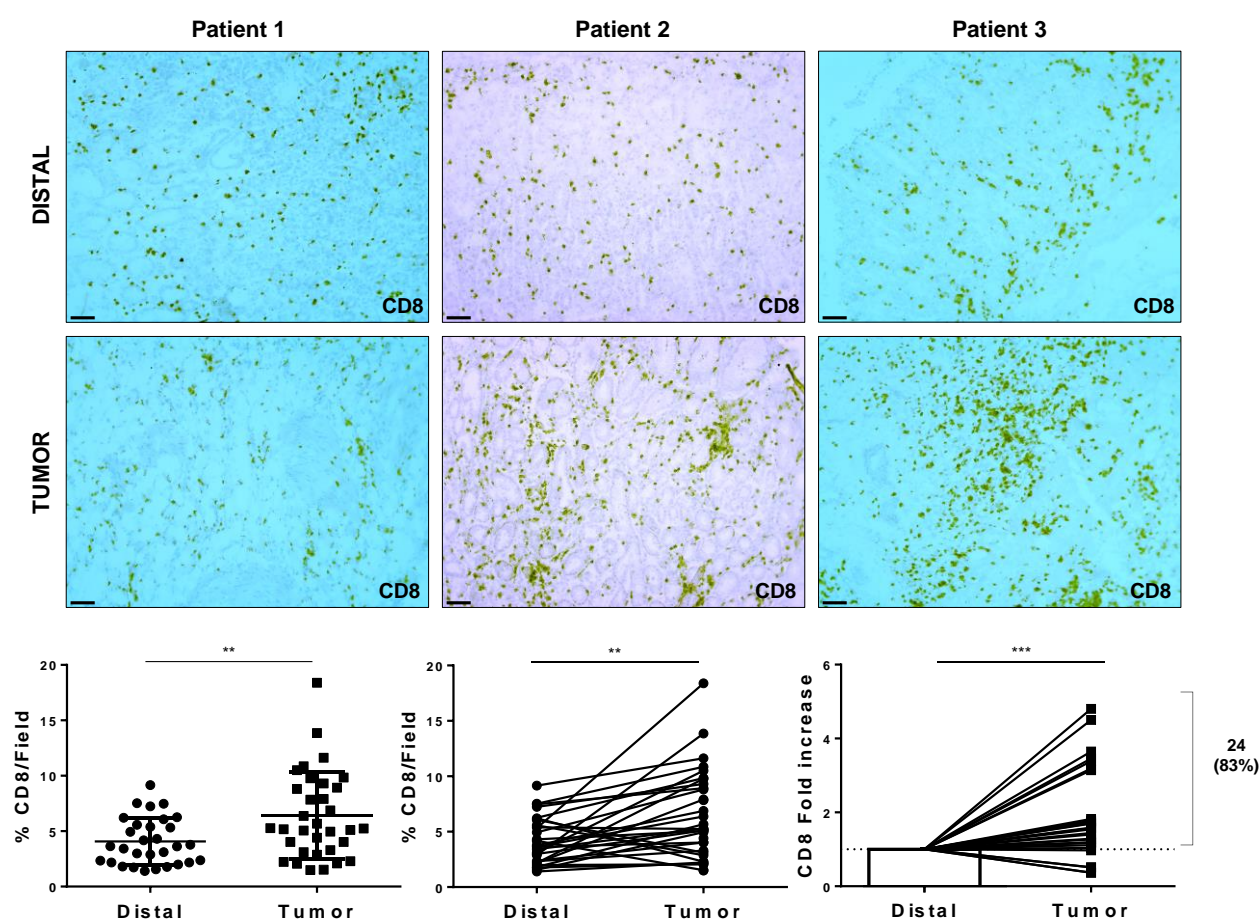
Encontramos un incremento en el porcentaje de células CD8+ por campo en los cortes de tejido tumoral ( $6,4\% \pm 0,7$   $n=33$ ) comparado con los cortes de tejido distal ( $4,1\% \pm 0,39$   $n=30$ , T-test  $p=0,006$ ), así como al realizar una comparación de muestras pareadas tumor-distal (diferencia media= 2,45; paired T-test  $p=0,002$ ). De la misma manera, encontramos un incremento relativo de células CD8+ infiltrantes del tejido tumoral con respecto al infiltrado de tejido sano en muestras pareadas (incremento medio=1,84; paired T-test  $p=0,001$ ), encontrando más células CD8+ en el tejido tumoral en un 82% de los casos estudiados (24 de 29). Con estos resultados podemos asegurar que existe un infiltrado de células CD8+ en los tumores de los pacientes con cáncer gástrico (Figura 18).

En cuanto al análisis de células PD1+, los resultados fueron semejantes a los obtenidos en el infiltrado de células CD8. Encontramos un mayor porcentaje de células PD1+ en los cortes de tejido tumoral ( $3,7\% \pm 0,6$   $n=27$ ) comparado con el tejido distal ( $1,5\% \pm 0,3$   $n=28$ , T-test  $p=0,002$ ), diferencia igualmente significativa en el análisis pareado de las muestras (diferencia media 2,00; paired T-test  $p=0,000$ ). Con respecto al incremento de células PD1+ entre tejido tumoral y distal, encontramos un aumento relativo de células PD1+ en el tejido tumoral con respecto al tejido distal de los pacientes (incremento medio=3,23; paired T-test  $p=0,001$ ). De nuevo, estos resultados indican una mayor infiltración de células PD1+ en el tejido tumoral de los pacientes con cáncer gástrico (Figura 19).

En el análisis de expresión de PDL1 en los tejidos, encontramos 9 tumores PDL1+, con distintos patrones de tinción (9 de 29), lo que supone un 31 % de tumores PDL1 positivos en nuestra cohorte de pacientes. La expresión de PDL1 en los cortes de tejido tumoral de los pacientes era variable, entre un 15 hasta un 40% de tinción por campo. No se encontró tinción PDL1+ en ninguno de los tejidos distales de los pacientes analizados.

Finalmente, en función de la expresión de PDL1, encontramos un aumento de células CD8 en el tejido tumoral de pacientes PDL1+ ( $10,0\% \pm 1,3$

n=9) comparado con los pacientes PDL1- ( $5,4 \% \pm 0,7$  n=20, T-test  $p=0,002$ ). Además, tanto el incremento de células CD8 como PD1 era mayor en pacientes PDL1 (+) ( $2,9 \% \pm 0,4$  n=9 y  $5,1 \% \pm 1,2$  n=5) comparado con pacientes PDL1- ( $1,3\% \pm 0,17$  n=20 T-test  $p=0,0003$  y  $1,9\% \pm 0,2$  n=17 T-test  $p=0,0003$ , respectivamente).

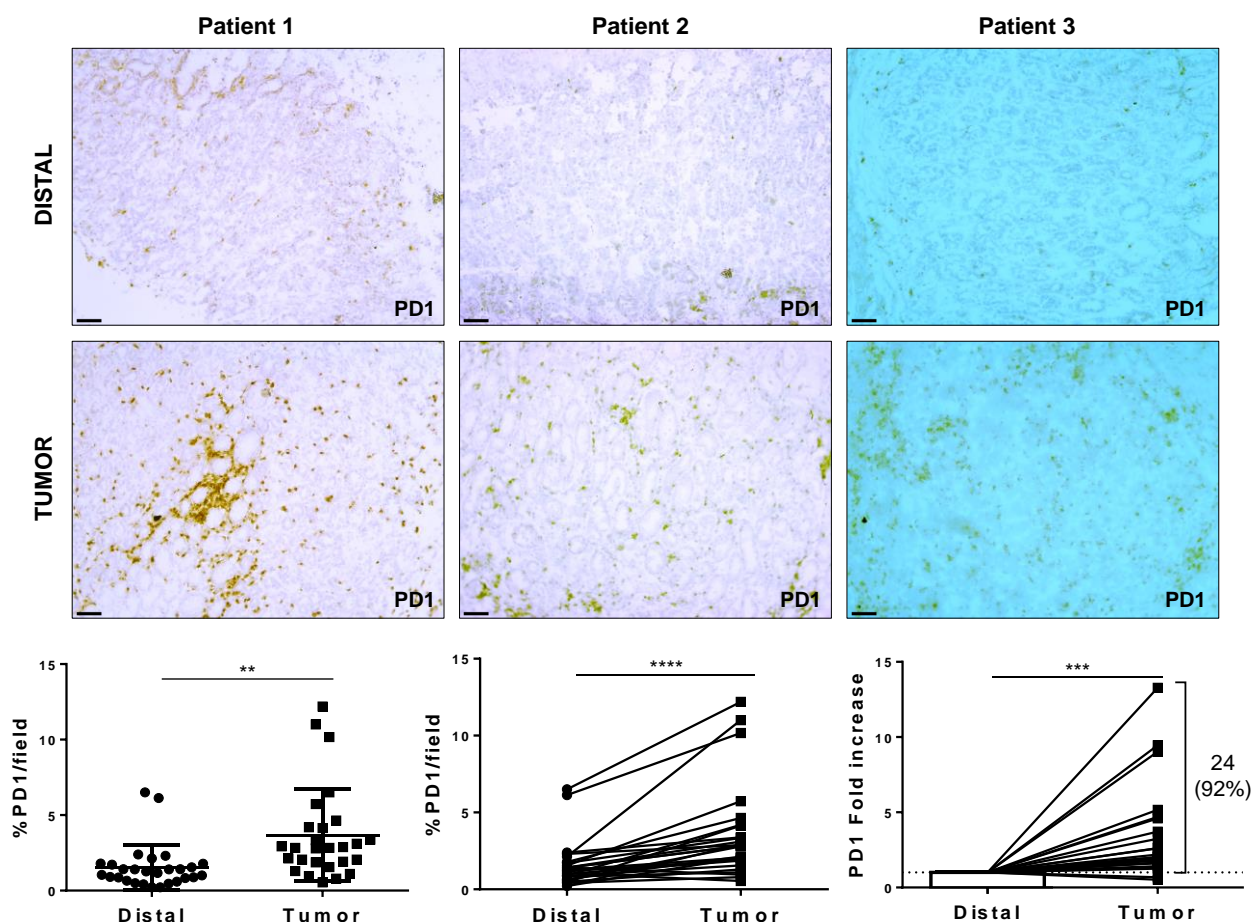


**Figura 18.** Tinción inmunohistoquímica de CD8+ cuantificación. Imágenes de las tinciones: Tres tinciones representativas (pacientes 1, 2 y 3) de CD8+. Se pueden observar cortes de tejido distal (paneles superiores) y tejido tumoral (paneles inferiores). Gráficas: Cuantificación de porcentaje de células CD8+ por campo en tejido distal (n=30) y tumoral (n=34) de pacientes con cáncer gástrico (izquierda), y análisis de muestras pareadas (centro) y ratio tumor/distal (derecha). Encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células CD8+, así como en la comparación de muestras pareadas y el incremento de células CD8+ en el tejido tumoral con respecto al distal. Se empleó el estadístico T-test y T-test pareado.

Niveles de significación: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$

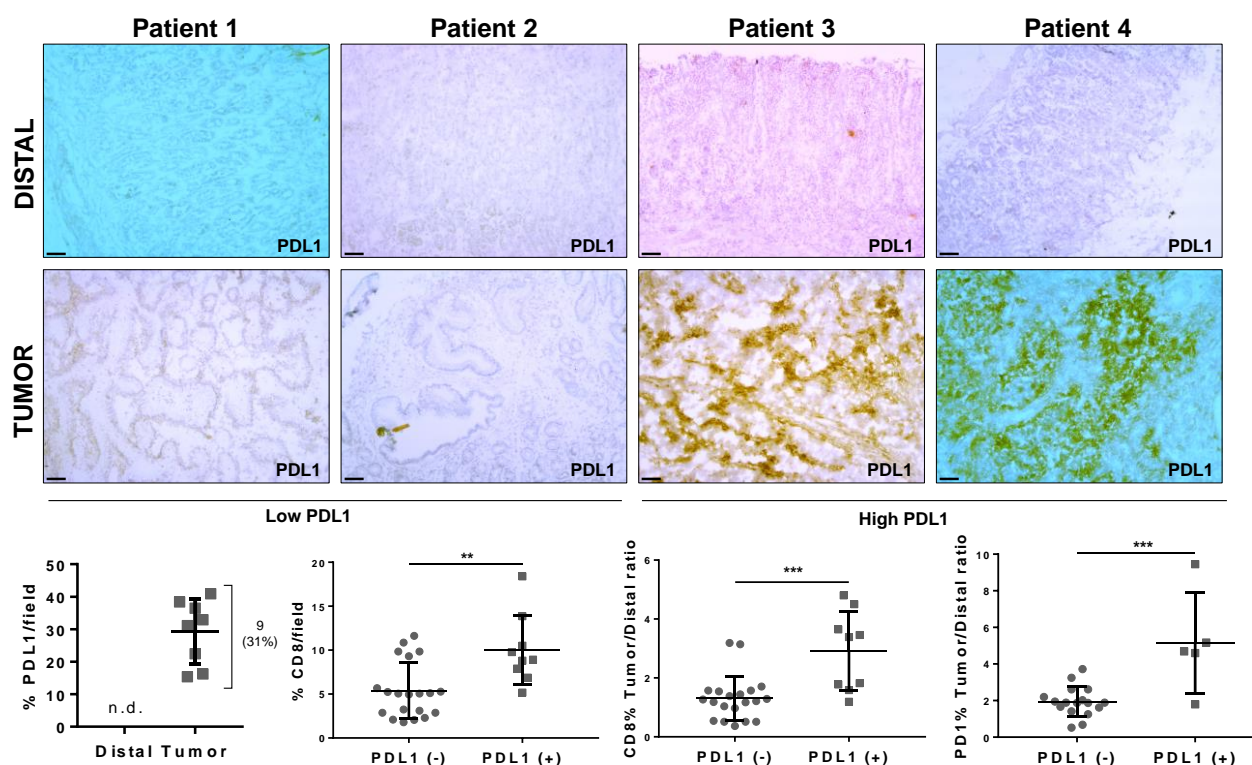




**Figura 19.** Tinción inmunohistoquímica de PD1+ y cuantificación. las tinciones: Tres tinciones representativas (pacientes 1, 2 y 3) de PD1+. Se pueden observar cortes de tejido distal (paneles superiores) y tejido tumoral (paneles inferiores). Gráficas: Cuantificación de porcentaje de células PD1+ por campo en tejido distal (n=28) y tumoral (n=27) de pacientes con cáncer gástrico (izquierda), y análisis de muestras pareadas (centro) y ratio tumor/distal (derecha). Encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células PD1+, así como en la comparación de muestras pareadas y el incremento de células PD1+ en el tejido tumoral con respecto al distal. Se empleó el estadístico T-test y T-test pareado.

Niveles de significación: \*\* →  $p < 0,01$ ; \*\*\* →  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* →  $p < 0,0001$ .

Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$



**Figura 20.** Tinción inmunohistoquímica de PDL1 y cuantificación de PDL1, CD8 PDL1, CD8 y PD1 en función de la expresión de PDL1.

Imágenes de las tinciones: Cuatro tinciones representativas (pacientes 1, 2, 3 y 4) de PDL1. Se pueden observar cortes de tejido distal y tejido tumoral con distintos patrones de tinción, negativos (a la izquierda) y positivos (a la derecha) para PDL1.

Gráficas: Cuantificación de porcentaje expresión de PDL1 (primero a la izquierda) de los 9 tumores PDL1+ (no se detectó PDL1 en el tejido distal de los pacientes) Encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células CD8+, así como en la ratio tumor/distal de células CD8+ y PD1+ en pacientes PDL1+ comparado con los PDL1-. Se empleó el estadístico T-test para las comparaciones entre grupos.

Niveles de significación: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$

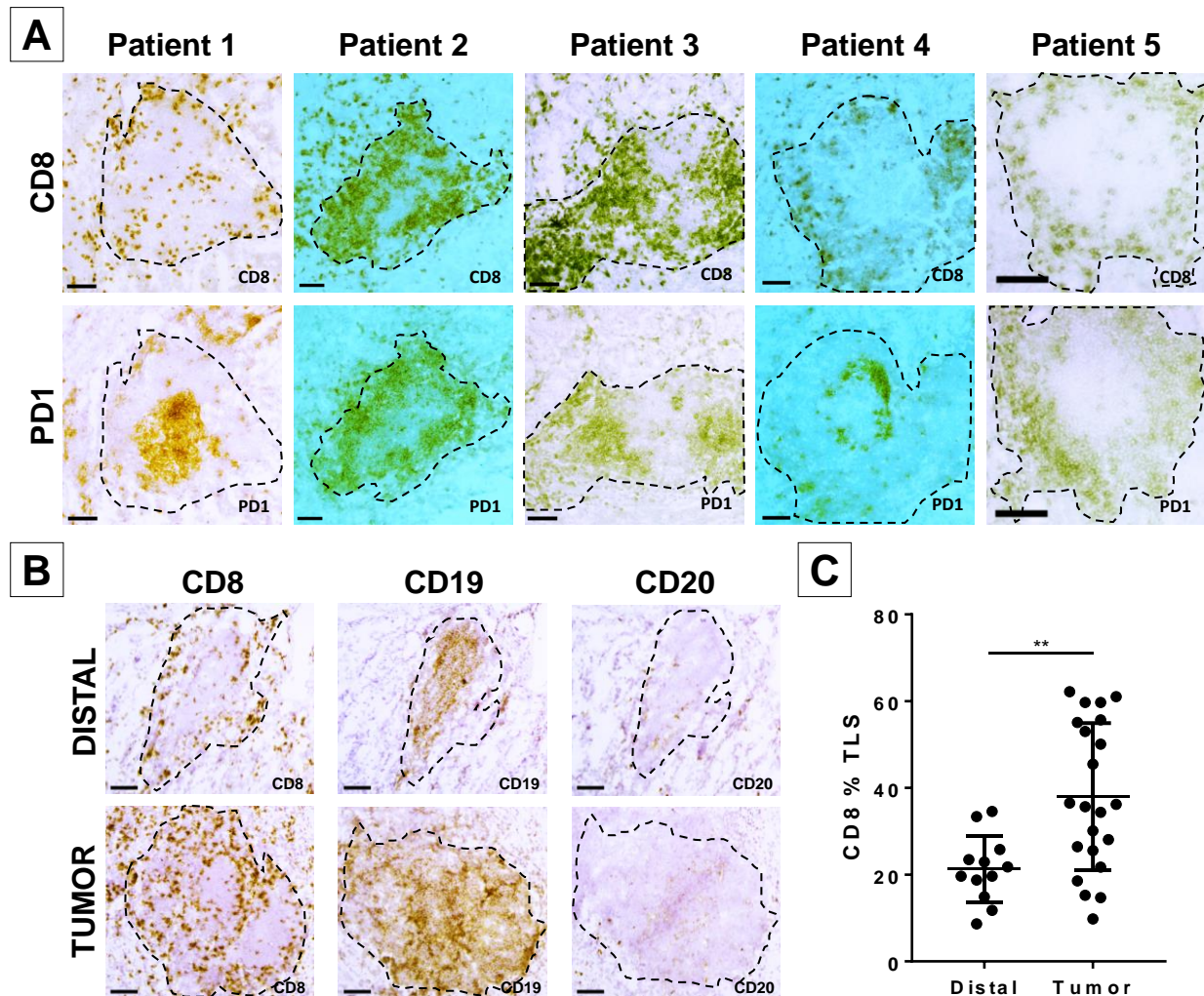
### 3.3. Estructuras Linfoides Terciarias (TLS)

Además de evaluar la frecuencia de linfocitos CD8 y PD1 presentes en los tejidos tumoral y distal de los pacientes, estas tinciones permitieron identificar unas estructuras linfoides ectópicas, encontradas con frecuencia en tejidos afectados por enfermedades inflamatorias y tumores, denominadas estructuras linfoides terciarias (TLS, en sus siglas en inglés). Si bien estas estructuras se encontraban tanto en tejido distal como tumoral, se vieron con mayor frecuencia en tejidos tumorales, aunque esta diferencia puede deberse a la ausencia de TLS en los cortes estudiados, más que a una ausencia total de estas estructuras en el tejido completo.

Para confirmar que estas estructuras fueran TLS, se complementaron los marcajes previamente realizados (CD8 y PD1) con tinciones para marcadores de células B (CD19 y CD20), que formarían los centros germinales de los TLS.

Tras analizar el conjunto de tinciones, se puede distinguir que la distribución de células en el interior de estas TLS es variable entre pacientes, siendo frecuentes las células T CD8+ en la periferia, células T PD1+ formando un anillo interior (figura 21A) y células CD19+ (pero CD20-) en el interior de los mismos (figura 21B).

Confirmamos, por tanto, que estas estructuras poseían células B, si bien parecían ser CD19+ CD20-. Además, comparando entre tejidos tumoral y distal, encontramos un aumento significativo en el porcentaje de células CD8 en el interior de las TLS en el tejido tumoral ( $37,9\% \pm 3,6$   $n=22$ ) comparado con las TLS de tejido distal ( $21,3\% \pm 2,2$   $n=12$ ; T-test  $p=0,003$ ) (figura 21C), lo que podría indicar una mayor activación de las células CD8 en el tejido tumoral, que se movilizan hacia el interior de las TLS tras su activación (ver más adelante, apartado de discusión).



**Figura 21.** Estructuras linfoides terciarias en pacientes con cáncer gástrico. A) Tinciones de cortes seriados de cinco pacientes representativos, CD8 en los paneles superiores y PD1 en los inferiores. Se pueden apreciar distintos patrones de distribución, con las células CD8+ ocupando la región periférica y parte del interior en algunos casos (pacientes 2 y 3) y PD1+ localizado en regiones interiores (pacientes 1 y 4) o con un patrón similar al de las células CD8 en la periferia (pacientes 2, 3 y 5). B) Tinciones representativas de CD8, CD19 y CD20 de cortes seriados de un paciente, tejidos tumor (paneles superiores) y distal (paneles inferiores). C) Comparación del porcentaje de CD8 en las TLS del tejido distal y tumoral de pacientes con cáncer gástrico. Encontramos un aumento significativo de células CD8+ en la TLS de tejido tumoral con respecto a las de tejido distal. Se empleó el test estadístico T-test. Niveles de significación: \*\*  $p < 0,01$ . Barras de escala = 100  $\mu$ m

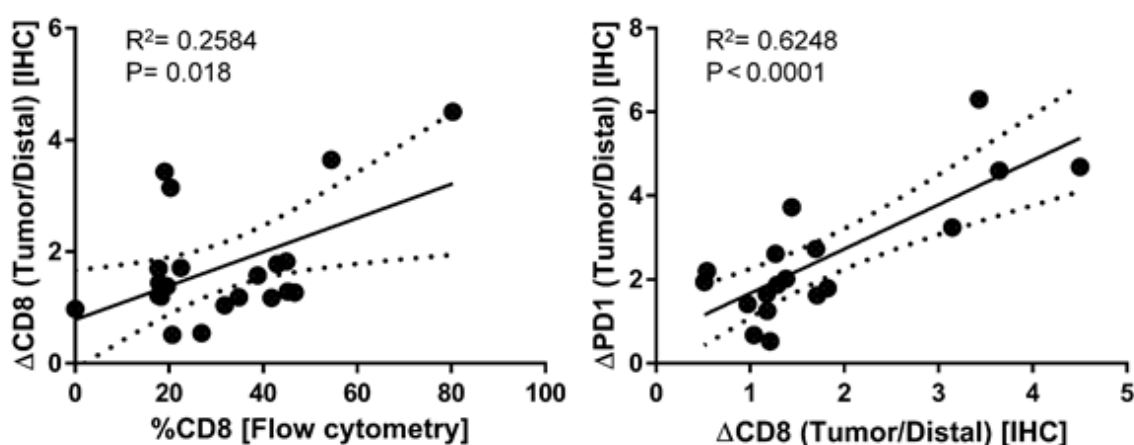


### 3.4. Análisis de correlación

Para determinar la existencia de una correlación entre las variables estudiadas en sangre periférica y tejidos, realizamos un análisis de correlación entre todos los parámetros estudiados (figura 22).

Encontramos una correlación significativa entre los datos de citometría e IHC, según los cuales la frecuencia de células CD8+ determinada por citometría de flujo en sangre periférica correlacionaría directamente, y de forma positiva con el incremento de células CD8 entre tejido distal y tumoral (ratio CD8 tumor/CD8 distal) ( $p=0,018$  y  $R^2=0,2584$ ).

Finalmente, encontramos una correlación significativa en el incremento de células CD8 entre tejido sano y distal con el incremento de células PD1 entre ambos tejidos ( $p<0.0001$  y  $R^2=0,6248$ ), datos que concuerdan con los determinados mediante citometría de flujo, donde las células CD8 mostraban un mayor porcentaje de células PD1 positivas que el resto de los linfocitos T de sangre periférica.



**Figura 22.** Análisis de correlación entre parámetros medidos en citometría de flujo e IHC en pacientes con cáncer gástrico.

## **DISCUSIÓN**

---

## **1. Polimorfismos del gen *TGFB1* y cáncer gástrico**

La búsqueda de marcadores capaces de identificar a los pacientes con adenocarcinoma gástrico propensos a desarrollar metástasis sigue siendo necesaria para identificar casos con mal pronóstico. El uso de este tipo de marcadores permite establecer un enfoque terapéutico. En este sentido, el estudio de los SNP del gen *TGFB1* estudiados puede ser de gran interés en la práctica clínica.

### **1.1. Variantes polimórficas del gen *TGFB1* como marcadores para el desarrollo y la evolución del cáncer gástrico**

Encontramos una asociación entre los polimorfismos rs1800471 y el desarrollo del cáncer gástrico (tabla 6A). En particular, la frecuencia del genotipo G/C es más del doble en el grupo de pacientes con cáncer gástrico (20,7%) que en los controles (8,4%; Base de datos *1000 Genomes*  $p=0,027$ ), lo que significa que poseer el genotipo rs1800471-G/C puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Además, el alelo C de este SNP está vinculado con una disminución de la expresión de la citoquina TGF- $\beta$ 1 (154). Como han demostrado otros autores (98, 155-158), la falta de señalización del TGF- $\beta$ 1 da lugar al desarrollo de tumores mucho más agresivos, ya sea espontáneos o en presencia de un carcinógeno, lo que sugiere que los bajos niveles de TGF- $\beta$ 1, junto con otros factores exógenos, pueden facilitar la aparición y progresión de tumores gástricos.

Algunos de los SNP analizados son capaces de identificar a los pacientes susceptibles de desarrollar enfermedad diseminada (estadio IV, según la clasificación de TNM) durante la progresión de la enfermedad, en comparación con los que tienen un cáncer temprano o con una diseminación local (estadios I, II y III, combinados) (tabla 6B y figura 8). En concreto, la frecuencia del genotipo G/A del SNP rs1800468, el genotipo T/T (rs1800469) y el haplotipo combinado ACTG (de los SNP rs1800468, rs1800469, rs1800470 y rs1800471, respectivamente) difieren significativamente entre ambos grupos de pacientes ( $p=0,04$ ;

0,008 y 0,02; respectivamente). Cabe destacar el caso particular del polimorfismo rs1800469, en el cual hallamos la ausencia completa de individuos T/T en los pacientes en estadio IV.

Los datos publicados anteriormente en otros tipos de tumores se centraron en estudios caso-control, en los que se comparaban controles sanos con pacientes, con el objetivo de determinar si estos polimorfismos eran potenciales herramientas de diagnóstico (159, 160). Pocos trabajos, especialmente aquellos centrados en cáncer gástrico, consideran el *TGFB1* como una herramienta para determinar el pronóstico de estos pacientes, considerando los distintos estadios TNM de la enfermedad. Ni las características demográficas (sexo y edad) de los pacientes ni otras características referentes a los tumores (localización y tipo histológico de los tumores) presentaban diferencias significativas en las frecuencias de los polimorfismos analizados entre sus respectivos subgrupos (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados indican que los marcadores genéticos aquí estudiados podrían estar involucrados en la progresión a etapas avanzadas de la enfermedad, como ocurre en otras patologías malignas de tipo epitelial, como el cáncer colorrectal (26, 27).

Los trabajos sobre la relación entre los polimorfismos del gen *TGFB1* y el desarrollo del cáncer gástrico, se centraron en la susceptibilidad a la enfermedad en estudios de casos y controles que comparaban una cohorte completa de pacientes con un grupo de control (28-31). Normalmente, no se realizaron subdivisiones de grupos según el estadio de los pacientes y, si lo fueron, se tomaron como grupo los pacientes de los estadios I y II y como otro grupo los pacientes de los estadios III o IV. Sin embargo, creemos que una división según la ausencia (estadio I, II y III) o la presencia (estadio IV) de la enfermedad diseminada avanzada es más sólida clínicamente y en términos de pronóstico (32), aunque puede limitar sustancialmente el número de pacientes disponibles para realizar comparaciones entre grupos. Contar con una cohorte mayor de pacientes, que incluya más representantes de cada uno de los estadios, especialmente del grupo IV, permitiría arrojar unos resultados más sólidos en un estudio de características similares al presente trabajo.



Como se ha mencionado anteriormente, estos polimorfismos de base única se localizan en áreas clave de la regulación genética de esta citoquina: dos de ellos en la región promotora y los otros dos en el exón 1, que codifica para el péptido señal de la proteína.

En cuanto a los SNPs de la región promotora, varios artículos describen su interacción con diferentes factores de transcripción que, en los procesos de regulación de esta citoquina durante la tumorigénesis, favorecerían o impedirían la unión de factores de transcripción activadores, como son CREB a rs1800468 o AP1 a rs1800469 (15, 34). Estos trabajos ya han demostrado su efecto modulador sobre la expresión de esta citoquina en diferentes condiciones patológicas de origen inflamatorio, como el asma (35).

El exón 1 del gen *TGFB1* codifica para el péptido señal de esta proteína y, por lo tanto, las variaciones en la secuencia de ADN pueden implicar cambios en la secreción de esta citoquina en el medio extracelular (13). Basándonos en los datos publicados anteriormente (101, 161-163) y en nuestros propios resultados, el aumento significativo de la frecuencia del haplotipo de ACTG en los pacientes en fase IV implica que estos individuos serían menos capaces de liberar TGF- $\beta$ 1 en el entorno del tumor. De hecho, otros trabajos describen que alteraciones en la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 en tumores epiteliales tienen un efecto funcional relevante en las etapas tempranas de la progresión tumoral (164, 165) si bien estas diferencias se pierden al observar a los pacientes en etapas más avanzadas de la patología (149, 150). De esta manera, los pacientes en estadios I, II y III con el haplotipo de riesgo desarrollarían metástasis de forma más precoz que los individuos con otra dotación genética, y, por tanto, tendrían un peor pronóstico a largo plazo, pese a catalogarse en estadios similares al momento del diagnóstico.

## **1.2. Polimorfismos del gen *TGFB1* y tasas de supervivencia**

Describimos un haplotipo *TGFB1* vinculado a la esperanza de vida. Así pues, la tasa de supervivencia de los pacientes de los estadios I, II y III con el haplotipo rs1800469-C/rs1800470-T es significativamente

inferior a la de aquellos pacientes que con el haplotipo alternativo (rs1800469-T/rs1800470-C) (figura 10C).

Una posible explicación es que, en los pacientes portadores del haplotipo en homocigosis, los niveles de TGF- $\beta$ 1 podrían ser inferiores a los de aquellos individuos con el haplotipo alternativo, en los cuales, una alta expresión de la citoquina en estadios tempranos facilitaría la recuperación tras la resección del tumor y el tratamiento.

Hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de un haplotipo extendido de *TGFB1* que afecta a las tasas de supervivencia en una población de pacientes con cáncer gástrico.

La presencia de polimorfismos del gen *TGFB1* que condicionan los cambios en la expresión de esta citoquina tendría un efecto funcional, aunque en menor medida, a la condición clínica encontrada en pacientes con mutaciones inactivantes del receptor TGFBR2. Las mutaciones de este receptor son muy frecuentes en otros tipos de neoplasias del tracto gastrointestinal (98) y también en otros tipos de tumores, como el glioblastoma (166), el hepatocarcinoma (158) y el adenocarcinoma de pulmón (157), en los que la reducción de la expresión del TGFBR2 aumenta la agresividad del tumor.

Por lo tanto, una disminución de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en las primeras etapas de la enfermedad implicaría un defecto en esta vía de señalización, similar a la ausencia de TGFBR2, reduciendo el efecto supresor de esta citoquina y causando una rápida progresión del tumor a etapas más severas (crecimiento del tumor, invasión de los ganglios linfáticos adyacentes y metástasis). Esto se vería reflejado en nuestros pacientes con el aumento de la frecuencia en los genotipos y el haplotipo de baja expresión (rs1800468-G/A, rs1800469-C/C, rs1800470-T/T) en el grupo de pacientes en estadio IV.

Tampoco podemos descartar la existencia de otros genes en desequilibrio de ligamiento con el gen *TGFB1*, pudiendo ser la distribución de los polimorfismos aquí encontrados un reflejo de alteraciones en genes heredados en bloque con la región estudiada. Serían necesarios estudios funcionales para determinar el efecto de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en la progresión del cáncer gástrico.

### 1.3. Expresión de TGF- $\beta$ 1 y evolución del cáncer gástrico

Al realizar la estimulación de PBMC de pacientes genotipados, aquellos portadores de los alelos rs1800468-A, rs1800469-C y rs1800470-T eran menos capaces de producir TGF- $\beta$ 1 (figura 9), de acuerdo con los datos publicados, que demostraban que el control genético del gen *TGFB1* modificaba los niveles circulantes y de expresión de esta citoquina (102, 163) y en diversos tipos de condiciones patológicas (161, 162). Por lo tanto, este efecto puede ocurrir en el entorno del tumor, lo que lleva a una menor producción de TGF- $\beta$ 1 en los pacientes portadores de los alelos mencionados y su haplotipo combinado (figura 8).

En línea con la idea anterior, pasamos a medir los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 (obtenidos antes del tratamiento y la resección del tumor) en un grupo de pacientes. Se encontraron niveles más bajos en pacientes con un tiempo de supervivencia inferior a 5 años (28,34 ng/mL  $\pm$  8,60; N=6) en comparación con los pacientes por encima de este punto de tiempo (48,34 ng/mL  $\pm$  4,89; N=24, p=0,03) y, en nuestras manos, 40 ng/mL de plasma TGF- $\beta$ 1 es un punto de corte adecuado para evaluar la supervivencia de los pacientes (figura 11).

En conjunto, estos datos apoyan la noción de que el TGF- $\beta$ 1 actúa como un supresor de tumores en esta malignidad particular, y que los altos niveles de esta citoquina limitan el crecimiento y la agresividad de este tumor.

En resumen, nuestros datos determinan que los pacientes con adenocarcinoma gástrico propensos a metástasis (tipo IV) muestran una mayor frecuencia de SNPs de *TGFB1* asociados con una menor producción de TGF- $\beta$ 1. Estos SNPs podrían ayudar a identificar a los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad diseminada avanzada y una menor esperanza de vida, lo que requeriría de un enfoque quirúrgico y terapéutico más agresivo en el momento del diagnóstico. Además, este hallazgo también podría explicar el doble papel propuesto de esta citoquina en la progresión del tumor: en las etapas iniciales de la

enfermedad, una baja expresión de TGF- $\beta$ 1 haría a los individuos más susceptibles a una evolución agresiva de la enfermedad. En esta misma línea de resultados, encontramos que los niveles plasmáticos de TFG- $\beta$ 1 eran más bajos en pacientes con una expectativa de vida reducida. Este tipo de efecto ha sido demostrado por otros autores en carcinoma de mama (167) y adenocarcinoma pancreático ductal en estadios tempranos (168), tumores de origen epitelial glandular como el cáncer gástrico.

Por lo tanto, sugerimos el análisis de SNPs rs1800468, rs1800469 y rs1800470 y los niveles de TGF- $\beta$ 1, como potenciales marcadores para identificar a los pacientes con cáncer gástrico de mal pronóstico.

Con estos resultados, proponemos un modelo en el cual presencia de TGF- $\beta$ 1 en etapas iniciales de la enfermedad es capaz de controlar la proliferación de las células tumorales, evitando así su progresión a etapas más avanzadas y su migración a nódulos linfáticos y colonización metastásica a largas distancias. Junto a otros factores, la falta de TGF- $\beta$ 1 debida a las variantes polimórficas del gen *TGFB1* favorecería la proliferación de las células tumorales y la progresión de la enfermedad.

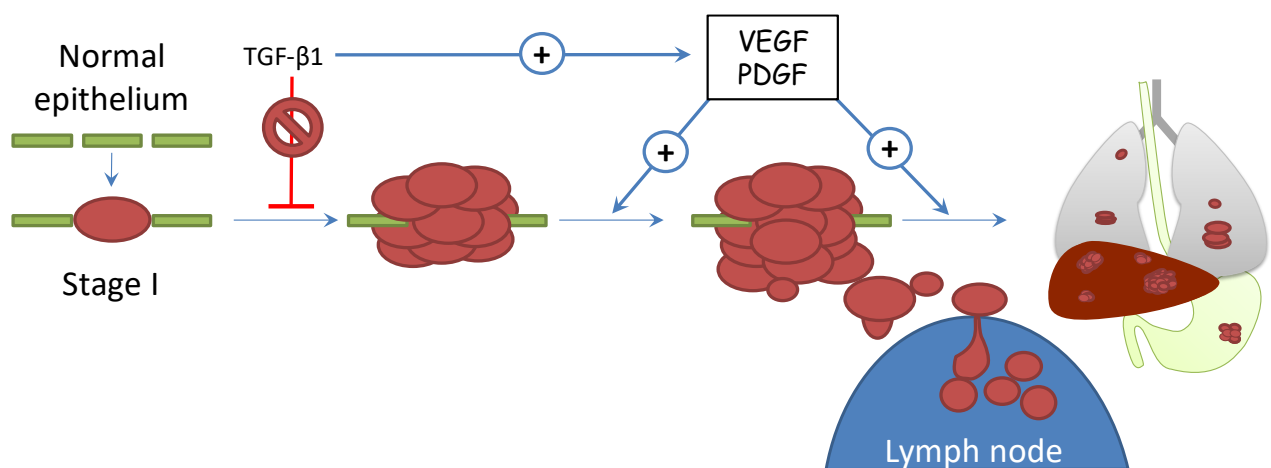


Figura 23. Modelo de progresión acelerada dependiente de TGF- $\beta$ 1.

## 2. Amplificaciones genéticas de HER2 en cáncer gástrico

Los pacientes con cáncer gástrico HER2+ son aptos para el uso de una terapia dirigida mediada por anticuerpos, como el trastuzumab y el pertuzumab. Sin embargo, las tasas de respuesta publicadas de la terapia anti-HER2 varían ampliamente, un hallazgo que se atribuye a la falta de métodos estandarizados para determinar la sobreexpresión y amplificaciones de HER2 (135, 169).

Por tanto, resulta indispensable contar con un procedimiento sólido y fiable para identificar pacientes capaces de beneficiarse de esta terapia. Actualmente, las metodologías más empleadas para la determinación de sobreexpresión de HER2 y la amplificación genética de *HER2* son la inmunohistoquímica y el FISH, respectivamente, técnicas que requieren en algunas ocasiones equipos y materiales costosos, así como profesionales con experiencia en tinciones histológicas. Además, ambas técnicas tienen una alta subjetividad, y el coste de las pruebas puede verse incrementado, debido a estos mismos resultados equívocos en determinados pacientes (170, 171).

Algunos estudios anteriores demostraron que la qPCR puede ser un enfoque complementario de utilidad para determinar la amplificación del HER2 en el cáncer de mama (172-174) y gástrico (175), pero no se centraron en el establecimiento de un procedimiento normalizado que permitiera a los laboratorios de todo el mundo evaluar una muestra como negativa o positiva. En este trabajo, analizamos la dPCR y la qPCR como dos técnicas complementarias y fácilmente estandarizables para analizar estas amplificaciones de HER2.

Proponemos aquí una metodología fiable basada en una genética molecular robusta y un procedimiento de exploración final para establecer un punto de corte por encima del cual los pacientes puedan ser considerados con confianza como HER2-positivos (figura 13). El empleo de ADN es más estable, más fácil de interpretar y tiene menos variación entre observadores. Además, el procedimiento aquí explicado no requiere

ningún otro paso de normalización y, por lo tanto, facilita las comparaciones entre laboratorios. Basta con que cada laboratorio utilice muestras de ADN de sujetos sanos para establecer su propio punto de corte y para posteriormente determinar la amplificación de HER2 en el ADN de los pacientes. Los resultados positivos o negativos no están sujetos a apreciaciones personales ni dependen de la fuente de reactivos (anticuerpos primarios o secundarios, fluoróforos...) utilizados en cada laboratorio. También determinamos que los tumores positivos de dPCR y qPCR son también positivos por IHC/IF (figura 14), lo que apoya que la combinación de estas metodologías es un enfoque eficaz para determinar la amplificación de HER2 en el adenocarcinoma gástrico.

Por último, determinamos que la presencia de amplificaciones de HER2 eran exclusivas del tejido tumoral, no encontrando este tipo de alteración en el tejido distal de los pacientes (tanto por dPCR/qPCR como por IHC/IF) lo que sugiere que la amplificación de HER2 es un evento específico del tejido tumoral, y no una condición preexistente en los pacientes con cáncer gástrico.

### **3. Estudio de poblaciones CD8, PD1 y tumores PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico**

La inmunoterapia en pacientes con tumores sólidos es uno de los enfoques terapéuticos más prometedores en la actualidad. Diversos inhibidores de puntos de control del sistema inmunitario ya han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de diversos tipos de tumores, como el melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama triple negativo, etc (176). Sin embargo, en algunos tipos tumorales (177) pueden ocurrir fenómenos de enfermedad hiperprogresiva o una baja respuesta al tratamiento. Estas tasas de respuesta baja pueden deberse a que los pacientes incluidos en los ensayos clínicos no han sido seleccionados previamente a su inclusión en el estudio, así como a la falta de marcadores que identifiquen pacientes con buen valor predictivo para estos tratamientos (91-93)

En el caso concreto del cáncer gástrico, se ha demostrado la eficacia de nivolumab (anti-PD1) en varios ensayos clínicos (178, 179), con tasas de

respuesta inferiores a las observadas en otros tipos tumorales. Sin embargo, estos estudios se centran en pacientes en fases muy avanzadas de la enfermedad (enfermedad metastática y estadios III y IV), así como en pacientes refractarios a terapias anteriores, y nunca se emplean en primera línea. Además, los pacientes incluidos en los ensayos clínicos no fueron seleccionados ni estratificados en función de ningún parámetro relativo al sistema inmunitario, como pudieran ser la infiltración de los tumores primarios por células citotóxicas (CD8) o PD1 (+). Si bien la expresión de PDL1 en los tumores (tomada en estos estudios como un 1% o más células tumorales que expresan PDL1 en cortes de tejido) puede ser un marcador pronóstico de utilidad en los pacientes con cáncer gástrico (180) la molécula PD-1 tiene otros posibles ligandos, como PDL2, que no se emplea como marcador en los ensayos clínicos, y ligandos solubles (sPDL1 y sPDL2) (181, 182), que podrían no ser detectados mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Otro de los marcadores empleados en clínica es la infiltración de células CD8 en el tejido tumoral, que se toma como un indicador de buen pronóstico en diversos tipos de cáncer (183, 184) y un buen valor predictivo para el tratamiento con inmunoterapia inhibidora de puntos de control (185). Se ha demostrado que pacientes con una alta tasa de mutaciones somáticas presentan un mayor grado de infiltración de linfocitos CD8 (186), dato íntimamente relacionado con la respuesta a terapia anti-PD1 (187).

Los estudios previamente mencionados no hacen referencia al cáncer gástrico, que es el quinto tipo de tumor con más mutaciones somáticas por megabase (153).

### **3.1. Células CD8 y PD1 en sangre periférica y tejido de pacientes con cáncer gástrico**

En el presente proyecto de tesis doctoral, hemos analizado la frecuencia de células CD8+ en sangre periférica y tejido de pacientes con cáncer gástrico (figuras 16, 17 y 18). Los resultados muestran que en la inmensa mayoría de los pacientes incluidos en el estudio (83%), hay un

incremento de células CD8+ en el tejido tumoral con respecto al tejido distal, sin que los pacientes hayan recibido ningún tipo de terapia previa a la resección de los tumores. Este dato se correlaciona ( $R^2=0.2584$ ) con el porcentaje de células CD8 detectadas en sangre periférica de los pacientes (figura 22). Aunque la frecuencia de células CD8 en la sangre periférica de los pacientes no resultó significativamente distinta con respecto a los controles, si encontramos una menor ratio CD8<sub>high</sub>/CD8<sub>low</sub> en el grupo de pacientes (figura 16), pudiendo ser esas células CD8<sub>low</sub> células con alta capacidad citotóxica (153) y las que, precisamente debido a su alta capacidad citotóxica, migren al tejido tumoral de los pacientes. Además, la población CD8<sub>low</sub> puede incluir células NK (188, 189), unas células con alta capacidad citotóxica en el contexto del cáncer (190). En los últimos años, se ha descrito que las células NK pueden expresar el marcador PD1, comprometiendo su actividad anti-tumoral (191), por lo que estudios centrados en estas poblaciones CD8<sub>low</sub>, y su distinción entre células NK y T CD8+ en el contexto de la respuesta inmunitaria frente a tumores podría dar información relevante de esta población en el cáncer gástrico.

Encontramos un aumento significativo de células CD8 en el tejido tumoral, empleando técnicas de inmunohistoquímica en cortes histológicos de los pacientes, mientras que la frecuencia de células CD8 obtenidas del cultivo de explantes de tumores resultó significativamente inferior al cultivo de explantes de tejido distal (figura 17), lo que podría indicar un defecto en la proliferación de los linfocitos CD8 en el microambiente tumoral. Esto puede deberse a que las células CD8 en el entorno del tumor se encuentran en un estado de “agotamiento” (del inglés, *exhaustion*), mediado por, entre otras moléculas, PD1. Estas células exhaustas son incapaces de proliferar, situación que se recuperaría al bloquear PD1 empleando anticuerpos monoclonales (192). Además, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que, en presencia de varios estímulos (como anti-CD2+IL-2, anti-CD3+IL-2 y IL-2), líneas de células T transformadas con Herpesvirus saimiri (HVS) procedentes de tumores gástricos mostraban defectos en su proliferación, comparado con líneas T control (193).

Si bien durante la realización de este proyecto no pudieron obtenerse datos que indicaran el estado de agotamiento de las células CD8 en el tejido



tumoral de los pacientes, el método para la obtención de linfocitos a partir del cultivo de explantes se optimizó, por lo que esperamos obtener resultados que apoyen esta hipótesis en futuros experimentos, principalmente mediante el análisis de muerte celular (anexina-V y 7-AAD), moléculas relacionadas con proliferación (Ki67) y anergia (LAG-3), así como ensayos funcionales de proliferación en respuesta a estímulos (CFSE con anti-CD3/CD28) en estas células.

PD1 es, además de un marcador de células activadas o exhaustas, una de las dianas más empleadas para el tratamiento con inmunoterapia bloqueante de puntos de control. En septiembre de 2017, la FDA aprobó el uso de pembrolizumab (anti-PD1) para el tratamiento de cáncer gástrico, pero únicamente en los casos de cáncer gástrico localmente avanzado o metastásico que expresaran PDL1, y en el que otras terapias sistémicas no hubieran tenido resultado (176). La aprobación de este fármaco se basó en los resultados obtenidos en el ensayo clínico KEYNOTE-059, donde se encontró una respuesta al tratamiento en un 25% de los pacientes, independientemente de la expresión de PDL1 (119). Por tanto, además de los pacientes PDL1 positivos (para los cuales está dirigido el tratamiento aprobado por la FDA), el resto de las pacientes con cáncer gástrico podrían beneficiarse de una terapia anti-PD1. En ninguno de los ensayos clínicos se ha valorado la expresión de PD1 en sangre periférica o tejido de los pacientes y, siendo esta molécula la diana de varios agentes terapéuticos (como el propio pembrolizumab), nos parece lógico determinar la expresión de este marcador en los pacientes con cáncer gástrico. En este trabajo, hemos encontrado un aumento muy significativo de la expresión de PD1 en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico, así como en el tejido tumoral, donde la mayoría de estos pacientes (92%) presentaban un incremento de células PD1+ en el tumor, con respecto a sus tejidos distales. Estos resultados van en consonancia con otros estudios que han determinado la expresión de PD1 en pacientes con cáncer gástrico, que han empleado citometría de flujo (194) o técnicas de inmunohistoquímica (195, 196) de forma independiente.

En nuestro estudio también determinamos que la expresión de PD1 es mayor en células CD8 en sangre periférica, y encontramos una correlación significativa entre la cantidad de células CD8 y PD1 en el tejido, dato que también indica que es precisamente en estas células con capacidad citotóxica donde se produce la mayor expresión de PD1 en el contexto del microambiente tumoral ( $R^2=0,6248$ ;  $p<0,0001$ ).

### **3.2. Expresión de PDL1 en cáncer gástrico**

En cuanto a la expresión de PDL1, el 31% de los pacientes analizados en este estudio presentaban una elevada expresión de esta molécula en el tejido tumoral, no así en sus respectivos tejidos distales. Analizando en detalle estos pacientes, encontramos que es precisamente en el grupo PDL1 (+) donde había una mayor acumulación de células CD8 y un mayor incremento de células PD1 con respecto a sus tejidos distales, dato que, de nuevo, nos lleva a pensar en que la acumulación de células CD8 exhaustas en estos tejidos es ineficaz para la eliminación de los tumores PDL1 (+), situación que podría ampliarse determinando la expresión de otros ligandos de PD1, como PDL2 y las formas solubles de ambas moléculas (sPDL1 y sPDL2).

### **3.3. Estructuras linfoides terciarias en cáncer gástrico**

Si bien su estudio no formaba parte de los objetivos iniciales de este proyecto, las tinciones de CD8 y PD1 determinaron la presencia de este tipo de folículos linfoides (figura 21), tanto en el tejido tumoral como en el distal. En el contexto de diversas patologías asociadas al estómago, la presencia de TLS no es un hecho anecdótico, pues ha sido descrito con anterioridad (197). Estas estructuras se localizan preferente entre las regiones la *muscularis mucosae* y la submucosa superior, de forma similar a lo encontrado en el tejido distal de nuestros pacientes. Si bien está descrita la presencia de células CD20 en el interior de estas estructuras, nuestras tinciones no revelaron la expresión de CD20, si no la del marcador CD19, es decir, la presencia de células B, como se había descrito con anterioridad en otros trabajos referentes a estas estructuras (198, 199).

A nivel estructural, con respecto a las tinciones CD8 y PD1 realizadas, encontramos que las células CD8 se situaban en la periferia, si bien en algunos pacientes cubrían gran parte del folículo hacia el interior, mientras que el marcador PD1 podía encontrarse tanto en periferia como en el interior de las estructuras linfoides. La presencia de PD1 en el interior de estas estructuras podría deberse a los linfocitos T foliculares, células localizadas en los centros germinales de los folículos linfoides que, entre otros marcadores, expresan PD1 en su superficie (200). Sin embargo, la presencia de células PD1+ en la periferia, coexistiendo con la presencia de células CD8+ en esa misma región, nos hace pensar que la activación de células CD8+ en el microambiente tumoral lleva a cambios visibles en estas estructuras linfoides terciarias. En los folículos presentes en los nódulos linfáticos, la presencia de linfocitos T CD8 en los centros germinales se produce en situaciones de infección viral crónica (201, 202). Si la respuesta anti-tumoral de las células CD8+ tiene los mismos principios que la respuesta frente a infecciones virales (reconocimiento de antígeno intracelular a través de MHC-I), es posible que los mecanismos posteriores a la activación de las células CD8 citotóxicas tenga efecto similar en los folículos de los nódulos linfáticos, así como en estructuras linfoides asociadas a los tejidos afectados, pues estas TLS tendrían una organización y función semejante a los órganos linfoides secundarios, como los nódulos linfáticos, permitiendo respuestas inmunes adaptativas funcionales capaces de influir en la progresión de la enfermedad (203). Por tanto, el aumento de células CD8 en las TLS del tejido distal de nuestros pacientes sería un indicativo de que se está produciendo una respuesta contra el tumor, en la que las células citotóxicas migran al interior de estos folículos y generan respuestas adaptativas anti-tumorales.

Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que existe una respuesta inmunitaria (mediada por células CD8 citotóxicas) en el cáncer gástrico, y que tener en cuenta los infiltrados de este tipo de células, además de la expresión de PD1 en sangre periférica y en el tejido afectado, pueden ser buenos indicativos para seleccionar pacientes

susceptibles de recibir inmunoterapia bloqueadora de puntos de control del sistema inmunitario. Además, si bien los resultados son preliminares, la presencia de estructuras linfoides asociadas a los tumores, con una alta frecuencia de células CD8+ y PD1+ en su interior, podrían servir como un indicativo adicional para la inclusión de pacientes en tratamientos con inmunoterapia. Esta es la primera vez que realiza un estudio y se relacionan los datos obtenidos a nivel de sangre periférica y tejido en la misma cohorte de pacientes con cáncer gástrico.

Como estudios adicionales a este trabajo, proponemos la evaluación funcional de los infiltrados linfoides del tumor (en comparación al tejido distal), con ensayos de activación (estimulación mediante anticuerpos anti-CD3/CD28 y PMA-ION y la expresión de IFN- $\gamma$ ), capacidad proliferativa (CFSE), así como estudios de expresión génica más complejos (RNAseq), que permitan determinar las diferencias existentes entre los linfocitos T CD8 del entorno tumoral con respecto a los del tejido distal. Así mismo, sería de gran interés el estudio completo de las estructuras linfoides asociadas a los tumores, y su comparación con estas mismas estructuras en el tejido distal, para lo cual se podrían emplear técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo, para estudiar las poblaciones presentes en este tipo de estructuras y su relación con la enfermedad.

Por último, no encontramos diferencias en la expresión de estos marcadores con respecto a las variantes demográficas y clínicas de los pacientes, lo que implica que estas observaciones son comunes a todos los pacientes. Sin embargo, nuestra cohorte es de un tamaño relativamente reducido, por lo que ampliar este estudio a una población de mayor tamaño, y la inclusión de otras características relacionadas con el desarrollo y evolución de los tumores (como la carga mutacional o la presencia de neo-antígenos) podría identificar características distintivas en pacientes con respecto a los marcadores aquí estudiados.

# **CONCLUSIONES**

---

## **Polimorfismos del gen *TGFB1* y cáncer gástrico**

1. La variante rs1800471-G/C es más frecuente en los pacientes con cáncer gástrico.
2. Las variantes rs1800468-G/A, rs1800469-C/C y el haplotipo combinado rs1800468-A/rs1800469-C/rs1800470-T/rs1800471-G identifican pacientes con cáncer gástrico con mal pronóstico y peor supervivencia.
3. Los polimorfismos rs1800469 y rs1800470 afectan a los niveles de TGF- $\beta$ 1 e identifican pacientes con menor supervivencia.
4. La expresión de TGF- $\beta$ 1 es menor en pacientes con una supervivencia inferior a 5 años.

## **Amplificaciones genéticas de HER2 en cáncer gástrico**

5. Las técnicas PCR diferencial y PCR cuantitativa permiten la determinación de amplificaciones del gen *HER2*, que se detectaron en un 25% los pacientes y de forma exclusiva en el tejido tumoral.

## **Estudio de poblaciones CD8, PD1 y expresión de PDL1 en sangre periférica, estómago y tumores de pacientes con cáncer gástrico**

6. Los pacientes con cáncer gástrico presentan una alta expresión de PD1 en linfocitos de sangre periférica
7. Encontramos la expresión de PDL1 en un 31% de los pacientes con cáncer gástrico
8. El tejido tumoral de los pacientes con cáncer gástrico presenta una elevada infiltración de células CD8+ y PD1+, aun más alta en pacientes PDL1+.
9. Los pacientes con cáncer gástrico presentan estructuras linfoides terciaras en el tejido tumoral y distal.
10. La determinación de los marcadores aquí analizados (CD8, PD1, PDL1 podrían identificar pacientes con cáncer gástrico susceptibles de beneficiarse de las terapias anti PD1/PDL1.

# **CONCLUSIONS**

### **TGFB1 gene polymorphisms and gastric cancer**

1. The rs1800471-G/C variant is more frequent in patients with gastric cancer.
2. The variants rs1800468-G/A, rs1800469-C/C and the combined haplotype rs1800468-A/rs1800469-C/rs1800470-T/rs1800471-G identify patients with gastric cancer with poor prognosis and worse survival.
3. The rs1800469 and rs1800470 polymorphisms affect TGF- $\beta$ 1 levels and identify patients with poorer survival.
4. The expression of TGF- $\beta$ 1 is lower in patients with a survival of less than 5 years.

### **Genetic amplification of HER2 in gastric cancer**

5. Differential PCR and quantitative PCR techniques allow the determination of amplifications of the HER2 gene, which were detected in 25% of patients and exclusively in the tumors.

### **Study of CD8, PD1 and PDL1 expression populations in peripheral blood, stomach and tumors of gastric cancer patients**

6. Patients with gastric cancer have a high expression of PD1 in peripheral blood lymphocytes.
7. We found the expression of PDL1 in 31% of patients with gastric cancer
8. The tumor tissue of gastric cancer patients shows a high infiltration of CD8+ and PD1+ cells, even higher in PDL1+ patients.
9. Patients with gastric cancer have tertiary lymphoid structures in the tumor and distal tissue.
10. The determination of the markers analyzed here (CD8, PD1, PDL1) could identify patients with gastric cancer who may benefit from anti-PD1/PDL1 therapies.



# REFERENCIAS

---

1. Wu TJ, Schriml LM, Chen QR, Colbert M, Crichton DJ, Finney R, et al. Generating a focused view of disease ontology cancer terms for pan-cancer data integration and analysis. *Database-Oxford*. 2015.
2. Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*. 2016;529(7584):43-7.
3. Hall A. Oncogenes - Implications for Human Cancer - a Review. *J Roy Soc Med*. 1984;77(5):410-6.
4. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2647-93.
5. Roukos DH, Murray S, Briasoulis E. Molecular genetic tools shape a roadmap towards a more accurate prognostic prediction and personalized management of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(3):308-12.
6. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157-62.
7. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
9. Chinnam M, Goodrich DW. RB1, development, and cancer. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:129-69.
10. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):275-83.
11. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;768:101-10.
12. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
13. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
14. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-15.
15. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
16. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*. 2019;20(5):299-309.
17. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med*. 2016;8(1):69.
18. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):437-47.
19. Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med*. 2009;41(12):849-57.
20. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res*. 2009;69(18):7243-51.
21. Stemmler MP, Eccles RL, Brabletz S, Brabletz T. Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):102-12.
22. Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2014;5.

23. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009;58(1):90-6.
24. Zhang Q, Zhu B, Li Y. Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. *Front Immunol*. 2017;8:71.
25. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
26. Du W, Yang M, Turner A, Xu C, Ferris RL, Huang J, et al. TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3).
27. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989-1004.
28. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200.
29. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011;476(7360):346-50.
30. Yang M, Soga T, Pollard PJ. Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3652-8.
31. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
32. Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*. 2018;13:1177271918755391.
33. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
34. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*. 1957;1(5022):779-86.
35. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982;55(3-4):329-33.
36. Zwirner NW, Ziblat A. Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Front Immunol*. 2017;8:25.
37. Osinska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(1):109-15.
38. Rossin A, Miloro G, Hueber AO. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
39. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
40. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:948501.
41. Seliger B. Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role in resistance to immunotherapies. *HLA*. 2016;88(5):213-20.
42. Pardoll DM. Distinct mechanisms of tumor resistance to NK killing: of mice and men. *Immunity*. 2015;42(4):605-6.

43. Alavi S, Stewart AJ, Kefford RF, Lim SY, Shklovskaya E, Rizos H. Interferon Signaling Is Frequently Downregulated in Melanoma. *Front Immunol.* 2018;9:1414.
44. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(4):275-87.
45. Lopez-Santalla M, Krishnan S, Valeri AP, Aguilera-Montilla N, Fisher CU, Perez-Blas M, et al. Defective CD3zeta chain expression in Herpesvirus saimiri (HVS)-derived T-cell lines in gastric adenocarcinoma. *Cell Immunol.* 2005;238(2):113-22.
46. Boniface JD, Poschke I, Mao Y, Kiessling R. Tumor-dependent down-regulation of the zeta-chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function. *Int J Cancer.* 2012;131(1):129-39.
47. Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedalscience.* 2017;11:721.
48. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, et al. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer.* 2006;106(7):1624-33.
49. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, et al. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:168.
50. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):157.
51. Strasser K, Birnleitner H, Beer A, Pils D, Gerner MC, Schmetterer KG, et al. Immunological differences between colorectal cancer and normal mucosa uncover a prognostically relevant immune cell profile. *Oncoimmunology.* 2019;8(2):e1537693.
52. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science.* 1974;183(4124):534-6.
53. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-91.
54. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001;97(1):192-7.
55. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(13):7556-61.
56. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000;192(5):755-60.
57. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
58. Smyth MJ. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2008;20(4):631.
59. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA. Spectrum of Cancer Risk Late After AIDS Onset in the United States. *Arch Intern Med.* 2010;170(15):1337-45.
60. Chapman JR, Webster AC, Wong G. Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(7).

61. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
62. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol*. 2014;5:197.
63. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):95-109.
64. Pahl J, Cerwenka A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*. 2017;222(1):11-20.
65. Ong CEB, Lyons AB, Woods GM, Flies AS. Inducible IFN-gamma Expression for MHC-I Upregulation in Devil Facial Tumor Cells. *Front Immunol*. 2018;9:3117.
66. Zhou F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol*. 2009;28(3-4):239-60.
67. Wang L, Wang Y, Song Z, Chu J, Qu X. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J Interferon Cytokine Res*. 2015;35(4):273-80.
68. Li W, Huang X, Tong H, Wang Y, Zhang T, Wang W, et al. Comparison of the regulation of beta-catenin signaling by type I, type II and type III interferons in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e47040.
69. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. 2018;7(9):4509-16.
70. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):658-70.
71. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):140.
72. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines*. 2019;4:7.
73. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):34-47.
74. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet*. 2009;373(9668):1033-40.
75. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *MAbs*. 2020;12(1):1703531.
76. Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2008;223:143-55.
77. Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the brake on the immune system: ipilimumab in melanoma and other tumors. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010;25(6):601-13.
78. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
79. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med*. 2003;198(1):39-50.
80. Jeker LT, Bour-Jordan H, Bluestone JA. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(3):a007807.
81. Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L. Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications. *Cancer J*. 2014;20(4):265-71.

82. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-86.
83. Haslam A, Prasad V. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Netw Open.* 2019;2(5):e192535.
84. Smyth MJ, Teng MW. 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. *Clin Transl Immunology.* 2018;7(10):e1041.
85. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078-92.
86. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. *Cancer Cell.* 2018;34(4):690.
87. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1889-94.
88. Ribas A, Hamid O, Daud A, Hodi FS, Wolchok JD, Kefford R, et al. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA.* 2016;315(15):1600-9.
89. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006-17.
90. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
91. Veenstra R, Kostine M, Cleton-Jansen AM, de Miranda NF, Bovee JV. Immune checkpoint inhibitors in sarcomas: in quest of predictive biomarkers. *Lab Invest.* 2018;98(1):41-50.
92. Pirker R. Biomarkers for immune checkpoint inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2019;31(1):24-8.
93. Duffy MJ, Crown J. Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Clin Chem.* 2019;65(10):1228-38.
94. Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82.
95. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001;29(2):117-29.
96. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 2005;8(5):369-80.
97. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF-beta: From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(6).
98. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;155:85-103.
99. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 2004;21(4):491-501.

100. Kashiwagi I, Morita R, Schichita T, Komai K, Saeki K, Matsumoto M, et al. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF-beta Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity*. 2015;43(1):65-79.
101. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003;63(10):2610-5.
102. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(1):93-7.
103. Robertson IB, Rifkin DB. Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(6).
104. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF-beta in Cancer. *J Clin Med*. 2017;6(1).
105. Honjo Y, Bian Y, Kawakami K, Molinolo A, Longenecker G, Boppana R, et al. TGF-beta receptor I conditional knockout mice develop spontaneous squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*. 2007;6(11):1360-6.
106. Gulubova M, Aleksandrova E, Vlaykova T. Promoter polymorphisms in TGFB1 and IL10 genes influence tumor dendritic cells infiltration, development and prognosis of colorectal cancer. *J Gene Med*. 2018;20(2-3):e3005.
107. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
108. Skierucha M, Milne AN, Offerhaus GJ, Polkowski WP, Maciejewski R, Sitarz R. Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype. *World J Gastroenterol*. 2016;22(8):2460-74.
109. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
110. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, Lee HS, Oh SC, Shim JJ, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res*. 2017.
111. Zhang W. TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chin J Cancer*. 2014;33(10):469-70.
112. Ismael NE, El Sheikh SA, Talaat SM, Salem EM. Mismatch Repair Proteins and Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2): Histopathological and Immunohistochemical Study. *Open Access Maced J Med Sci*. 2017;5(1):9-13.
113. Garattini SK, Basile D, Cattaneo M, Fanotto V, Ongaro E, Bonotto M, et al. Molecular classifications of gastric cancers: Novel insights and possible future applications. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9(5):194-208.
114. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 2016;44(3):698-711.
115. Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, Xiao N, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(12):2965-70.

116. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015;5(1):43-51.
117. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9742):687-97.
118. Jiang JT, Shen YP, Wu CP, Zhu YB, Wei WX, Chen LJ, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16(48):6155-62.
119. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(5):e180013.
120. Bang YJ, Kang YK, Catenacci DV, Muro K, Fuchs CS, Geva R, et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study. *Gastric Cancer.* 2019;22(4):828-37.
121. Boku N, Ryu MH, Kato K, Chung HC, Minashi K, Lee KW, et al. Safety and efficacy of nivolumab in combination with S-1/capecitabine plus oxaliplatin in patients with previously untreated, unresectable, advanced, or recurrent gastric/gastroesophageal junction cancer: interim results of a randomized, phase II trial (ATTRACTION-4). *Ann Oncol.* 2019;30(2):250-8.
122. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med.* 2011;9:204.
123. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel).* 2018;6(2).
124. Hu WQ, Wang LW, Yuan JP, Yan SG, Li JD, Zhao HL, et al. High expression of transform growth factor beta 1 in gastric cancer confers worse outcome: results of a cohort study on 184 patients. *Hepatogastroenterology.* 2014;61(129):245-50.
125. Ohue M, Tomita N, Monden T, Miyoshi Y, Ohnishi T, Izawa H, et al. Mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene and microsatellite instability in gastric cancer. *Int J Cancer.* 1996;68(2):203-6.
126. Han SU, Kim HT, Seong DH, Kim YS, Park YS, Bang YJ, et al. Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene.* 2004;23(7):1333-41.
127. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2015;147:22-31.
128. Bai X, Yi M, Jiao Y, Chu Q, Wu K. Blocking TGF-beta Signaling To Enhance The Efficacy Of Immune Checkpoint Inhibitor. *Onco Targets Ther.* 2019;12:9527-38.



129. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19(13):3159-67.
130. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.
131. Matsui A, Ihara T, Suda H, Mikami H, Semba K. Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomol Concepts*. 2013;4(6):567-82.
132. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, Jr., et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014;32(33):3744-52.
133. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*. 2012;2012:743193.
134. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323-33.
135. Warneke VS, Behrens HM, Boger C, Becker T, Lordick F, Ebert MP, et al. Her2/neu testing in gastric cancer: evaluating the risk of sampling errors. *Ann Oncol*. 2013;24(3):725-33.
136. Gordon MA, Gundacker HM, Benedetti J, Macdonald JS, Baranda JC, Levin WJ, et al. Assessment of HER2 gene amplification in adenocarcinomas of the stomach or gastroesophageal junction in the INT-0116/SWOG9008 clinical trial. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1754-61.
137. Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Muller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol*. 2010;32(1-2):57-65.
138. Kunz PL, Mojtahed A, Fisher GA, Ford JM, Chang DT, Balise RR, et al. HER2 expression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a US population: clinicopathologic analysis with proposed approach to HER2 assessment. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(1):13-24.
139. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*. 2005;16(2):273-8.
140. Xie SD, Xu CY, Shen JG, Jiang ZN, Shen JY, Wang LB. HER 2/neu protein expression in gastric cancer is associated with poor survival. *Mol Med Rep*. 2009;2(6):943-6.
141. Kanayama K, Imai H, Usugi E, Shiraishi T, Hirokawa YS, Watanabe M. Association of HER2 gene amplification and tumor progression in early gastric cancer. *Virchows Arch*. 2018;473(5):559-65.
142. Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Caruso RA, Tuccari G. HER2 Status in Premalignant, Early, and Advanced Neoplastic Lesions of the Stomach. *Dis Markers*. 2015;2015:234851.
143. Marchio C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol*. 2020.

144. Kim KS, Sekar RR, Patil D, Dimarco MA, Kissick HT, Bilen MA, et al. Evaluation of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression as a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1413519.
145. Kahlmeyer A, Stohr CG, Hartmann A, Goebell PJ, Wullich B, Wach S, et al. Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *J Clin Med*. 2019;8(5).
146. Dai X, Xue J, Hu J, Yang SL, Chen GG, Lai PBS, et al. Positive Expression of Programmed Death Ligand 1 in Peritumoral Liver Tissue is Associated with Poor Survival after Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol*. 2017;10(4):511-7.
147. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1757-61.
148. Kamel HFM, Al-Amodi H. Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2017;15(4):220-35.
149. Choi YJ, Kim N, Shin A, Lee HS, Nam RH, Chang H, et al. Influence of TGFB1 C-509T polymorphism on gastric cancer risk associated with TGF-beta1 expression in the gastric mucosa. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):526-37.
150. Zhang P, Di JZ, Zhu ZZ, Wu HM, Wang Y, Zhu G, et al. Association of transforming growth factor-beta 1 polymorphisms with genetic susceptibility to TNM stage I or II gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2008;38(12):861-6.
151. Rodriguez-Juan C, Sala-Silveira L, Perez-Blas M, Valeri AP, Aguilera N, Lopez-Santalla M, et al. Increased levels of bovine serum albumin antibodies in patients with type 1 diabetes and celiac disease-related antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37(2):132-5.
152. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*. 2008;19(9):1523-9.
153. Trautmann A, Ruckert B, Schmid-Grendelmeier P, Niederer E, Brocker EB, Blaser K, et al. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunology*. 2003;108(3):305-12.
154. Pooja S, Francis A, Rajender S, Tamang R, Rajkumar R, Saini KS, et al. Strong impact of TGF-beta1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case-control and population-based study. *PLoS One*. 2013;8(10):e75979.
155. Guasch G, Schober M, Pasolli HA, Conn EB, Polak L, Fuchs E. Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia. *Cancer Cell*. 2007;12(4):313-27.
156. Cassar L, Nicholls C, Pinto AR, Chen R, Wang L, Li H, et al. TGF-beta receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. *Protein Cell*. 2017;8(1):39-54.
157. Xu JB, Bao Y, Liu X, Liu Y, Huang S, Wang JC. Defective expression of transforming growth factor beta type II receptor (TGFB2) in the large cell variant of non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2007;58(1):36-43.
158. Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, et al. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Lab Invest*. 2010;90(9):1339-45.

159. Lin XD, Li C, Shi Y, Chen Y, Zhang LY, Zheng XW. [Correlation of polymorphism of Nme1-1465 T>C and TGFbeta1-509 T>C with genetic susceptibility of gastric carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2010;39(10):681-5.
160. Jin G, Wang L, Chen W, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, et al. Variant alleles of TGFB1 and TGFB2 are associated with a decreased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*. 2007;120(6):1330-5.
161. Arosio B, Bergamaschini L, Galimberti L, La Porta C, Zanetti M, Calabresi C, et al. +10 T/C polymorphisms in the gene of transforming growth factor-beta1 are associated with neurodegeneration and its clinical evolution. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(10):553-7.
162. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 2000;101(24):2783-7.
163. Stuart WD, Guo M, Fink-Baldauf IM, Coleman AM, Clancy JP, Mall MA, et al. CRISPRi-mediated functional analysis of lung disease-associated loci at non-coding regions. *NAR Genom Bioinform*. 2020;2(2):lqaa036.
164. Bottinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mumy M, Hemmati P, Bagnall K, et al. Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J*. 1997;16(10):2621-33.
165. Amendt C, Schirmacher P, Weber H, Blessing M. Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene*. 1998;17(1):25-34.
166. Narushima Y, Kozuka-Hata H, Koyama-Nasu R, Tsumoto K, Inoue J, Akiyama T, et al. Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals Transforming Growth Factor-beta Receptor type-2 (TGFB2) as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(3):1017-31.
167. Paiva CE, Drigo SA, Rosa FE, Moraes Neto FA, Caldeira JRF, Soares FA, et al. Absence of transforming growth factor-beta type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. *Ann Oncol*. 2010;21(4):734-40.
168. Glazer ES, Welsh E, Pimiento JM, Teer JK, Malafa MP. TGFbeta1 overexpression is associated with improved survival and low tumor cell proliferation in patients with early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(1):999-1006.
169. Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM. HER2 testing: current status and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(2):276-84.
170. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805.
171. Yamashita-Kashima Y, Shu S, Yoroze K, Hashizume K, Moriya Y, Fujimoto-Ouchi K, et al. Importance of formalin fixing conditions for HER2 testing in gastric cancer: immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridization. *Gastric Cancer*. 2014;17(4):638-47.
172. Jacquemier J, Spyrtos F, Esterni B, Mozziconacci MJ, Antoine M, Arnould L, et al. SISH/CISH or qPCR as alternative techniques to FISH for

determination of HER2 amplification status on breast tumors core needle biopsies: a multicenter experience based on 840 cases. *BMC Cancer*. 2013;13:351.

173. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, Dawson A, Myal Y. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol*. 2006;6:2.

174. Tvrdik D, Stanek L, Skalova H, Dundr P, Velenska Z, Povysil C. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer. *Mol Med Rep*. 2012;6(2):439-43.

175. Stanek L, Rozkos T, Laco J, Ryska A, Petruzalka L, Dura M, et al. Comparison of immunohistochemistry, four in situ hybridization methods and quantitative polymerase chain reaction for the molecular diagnosis of HER2 status in gastric cancer: a study of 55 cases. *Mol Med Rep*. 2014;10(5):2669-74.

176. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).

177. Kanjanapan Y, Day D, Wang L, Al-Sawaihey H, Abbas E, Namini A, et al. Hyperprogressive disease in early-phase immunotherapy trials: Clinical predictors and association with immune-related toxicities. *Cancer*. 2019;125(8):1341-9.

178. Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390(10111):2461-71.

179. Janjigian YY, Bendell J, Calvo E, Kim JW, Ascierto PA, Sharma P, et al. CheckMate-032 Study: Efficacy and Safety of Nivolumab and Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Metastatic Esophagogastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(28):2836-44.

180. Morihiro T, Kuroda S, Kanaya N, Kakiuchi Y, Kubota T, Aoyama K, et al. PD-L1 expression combined with microsatellite instability/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a useful prognostic biomarker in gastric cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):4633.

181. Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2003;33(11):3117-26.

182. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93-103.

183. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer*. 2006;94(2):275-80.

184. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542-e51.

185. Varn FS, Wang Y, Mullins DW, Fiering S, Cheng C. Systematic Pan-Cancer Analysis Reveals Immune Cell Interactions in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*. 2017;77(6):1271-82.

186. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 2017;377(25):2500-1.

187. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69-74.
188. Lucia B, Jennings C, Cauda R, Ortona L, Landay AL. Evidence of a selective depletion of a CD16+ CD56+ CD8+ natural killer cell subset during HIV infection. *Cytometry*. 1995;22(1):10-5.
189. Jonges LE, Albertsson P, van Vlierberghe RL, Ensink NG, Johansson BR, van de Velde CJ, et al. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scand J Immunol*. 2001;53(2):103-10.
190. Larsen SK, Gao Y, Basse PH. NK cells in the tumor microenvironment. *Crit Rev Oncog*. 2014;19(1-2):91-105.
191. Pesce S, Greppi M, Grossi F, Del Zotto G, Moretta L, Sivori S, et al. PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol*. 2019;10:1242.
192. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res*. 2013;73(12):3591-603.
193. Valeri AP, Aguilera-Montilla N, Lopez-Santalla M, Mencia A, Rodriguez-Juan C, Gutierrez-Calvo A, et al. Herpesvirus saimiri transformation may help disclose inherent functional defects of mucosal T lymphocytes in patients with gastric adenocarcinoma. *Immunol Cell Biol*. 2008;86(3):289-91.
194. Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M. Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2013;107(5):517-22.
195. Svensson MC, Borg D, Zhang C, Hedner C, Nodin B, Uhlen M, et al. Expression of PD-L1 and PD-1 in Chemoradiotherapy-Naive Esophageal and Gastric Adenocarcinoma: Relationship With Mismatch Repair Status and Survival. *Front Oncol*. 2019;9:136.
196. Xing X, Guo J, Ding G, Li B, Dong B, Feng Q, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1356144.
197. Carney JA. Gastric mucosal lymphoid follicles: histology, distribution, frequency, and etiologic features. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(7):1019-24.
198. Sakimura C, Tanaka H, Okuno T, Hiramatsu S, Muguruma K, Hirakawa K, et al. B cells in tertiary lymphoid structures are associated with favorable prognosis in gastric cancer. *J Surg Res*. 2017;215:74-82.
199. Yamakoshi Y, Tanaka H, Sakimura C, Deguchi S, Mori T, Tamura T, et al. Immunological potential of tertiary lymphoid structures surrounding the primary tumor in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2020;57(1):171-82.
200. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007;179(8):5099-108.
201. He R, Hou S, Liu C, Zhang A, Bai Q, Han M, et al. Follicular CXCR5-expressing CD8(+) T cells curtail chronic viral infection. *Nature*. 2016;537(7620):412-28.
202. Leong YA, Chen Y, Ong HS, Wu D, Man K, Deleage C, et al. CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nat Immunol*. 2016;17(10):1187-96.

203. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):447-62.

# ANEXOS

---

- 1. Curriculum vitae (Formato CVN FECYT)**
- 2. Artículos como primer autor (enviados para su publicación)**





## Ignacio Juárez Martín-Delgado

Generado desde: Editor CVN de FECYT

Fecha del documento: 23/09/2020

**v 1.4.3**

be7b6280fab780be8cbb6a52ecbdac05

Este fichero electrónico (PDF) contiene incrustada la tecnología CVN (CVN-XML). La tecnología CVN de este fichero permite exportar e importar los datos curriculares desde y hacia cualquier base de datos compatible. Listado de Bases de Datos adaptadas disponible en <http://cvn.fecyt.es/>



## Resumen libre del currículum

Descripción breve de la trayectoria científica, los principales logros científico-técnicos obtenidos, los intereses y objetivos científico-técnicos a medio/largo plazo de la línea de investigación. Incluye también otros aspectos o peculiaridades importantes.

### DATOS PERSONALES

Ignacio Juárez Martín-Delgado

F. de Nacimiento: 24/11/1992

Domicilio: Calle Fuencarral 122 5º Izda. 28010 Madrid

Tel: 606 741 735

Email: ignajuar@ucm.es

### FORMACIÓN ACADÉMICA

2010-2014. G. en Biología. Universidad Complutense de Madrid. Especialidad en Biología Sanitaria

2014-2015. Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina. UCM

2015-actualmente. Doctorado en Investigación Biomédica UCM

### IDIOMAS

Inglés: Nivel alto. Capacidad para comprender textos científicos especializados

### EXPERIENCIA

- Contrato Predoctoral de Personal Investigador en Formación de la UCM - Turno RCC en Harvard. (Feb. 2017 - Act)

- Estancia Predoctoral Harvard University - Harvard Medical School - Beth Israel Deaconess Medical Center (Junio-Septiembre 2019)

- Dpto. de Inmunología (Microbiología I) de la Fac. de Medicina en el estudio de pacientes con adenocarcinoma gástrico bajo tutela del Profesor José Manuel Martín Villa en el proyecto de investigación FIS PI12/01663 (Nov. 2014 – Act.)

- Dpto. de Biología Molecular y Bioquímica en la UCM en el estudio de pacientes con esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica y obe. mórbida. (Feb. – Jun. 2014)

### CONGRESOS - PRIMER AUTOR

- Comunicación para el 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 2015

- Comunicación para la IV Jornada de la Sociedad de Inmunología de la comunidad de Madrid (SICAM) 2015
- Comunicación Oral para el II Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (FIT-CANCER II) 2016
- Comunicación Oral para el 39 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) 2016
- Comunicaciones (Oral y póster) para la VII Jornada Científica SICAM-2016
- Comunicación para el 1st European Congress of Immunotherapies in Cancer (ECIC) Barcelona 2016
- Comunicación para el 4th Symposium on Biomedical Research. Madrid 2017
- Comunicaciones para el 40 Congreso de la SEI 2017, Zaragoza
- Comunicación para el PhDay 2017, Madrid
- Comunicación para SICAM 2018
- Comunicación para el FIT-CANCER IV 2018, Madrid

#### DOCENCIA:

- Organización y Colaboración en Proyecto de Inn. Educativa Poster competition as learning tool in Sciences. 4º G. en Bioquímica, 2018
- Docencia Grado en Med. en las Clases Prácticas de la asignatura Inmunología con autorización del Dpto Microbiología I (Inmunología) 2014-2015
- Docencia G. en Med. en las Clases Prácticas de la asignatura Inmunología con autorización del Dpto Microbiología I (Inmunología) 2015-2016
- Docencia G. en Med. en las Clases Prácticas de la asignatura Inmunología con autorización del Dpto Microbiología I (Inmunología) 2016-2017
- Docencia G. en Med. en las Clases Prácticas de la asignatura Inmunología con autorización del Dpto Inmunología, Oftalmología y ORL 2017-2018
- Tutor de Firat Ozcelik de la International Federation of Medical Students' Associations (IFMSA). Jul. 2015
- Tutor de Tsun Fu Tsai de la IFMSA. Jul. 2016
- Tutor de Gustavo Lami de la IFMSA. Ene. 2017
- Tutor de Ricarda Volz del programa Erasmus-Traineeship. De Abr. a May. 2018

#### Otros datos de interés

- IV Seminario de Formación en Protección Radiológica
- Colegiado en el C. de Biólogos de la C. de Madrid desde 2014
- Miembro de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) desde el año 2015
- Participación XVII Week of Science "Immune World"

#### Cursos

- WOS básico y avanzado (FECYT) 2017
- Implicación del S. de Complemento en patología renal. Nov. 2016
- English For Academic Writing and Publishing. Jul 2017



## Indicadores generales de calidad de la producción científica

Descripción breve de los principales indicadores de calidad de la producción científica (sexenios de investigación, tesis doctorales dirigidas, citas totales, publicaciones en primer cuartil (Q1), índice h....). Incluye también otros aspectos o peculiaridades importantes.

Nº Artículos publicados y aceptados: 28

Nº de Citas: 32

Índice h (Google Scholar): 4



## Ignacio Juárez Martín-Delgado

Apellidos: Juárez Martín-Delgado  
Nombre: Ignacio  
DNI: 06010320Y  
Fecha de nacimiento: 24/11/1992  
Sexo: Hombre  
Nacionalidad: España  
País de nacimiento: España  
C. Autón./Reg. de nacimiento: Comunidad de Madrid  
Provincia de contacto: Madrid  
Ciudad de nacimiento: Madrid  
Dirección de contacto: Calle Fuencarral 122  
Código postal: 28010  
País de contacto: España  
C. Autón./Reg. de contacto: Comunidad de Madrid  
Ciudad de contacto: Madrid  
Teléfono fijo: (0034) 91454513  
Correo electrónico: ignajuar@ucm.es  
Teléfono móvil: (0034) 606741735  
Página web personal: <https://rcc.harvard.edu/people/ignacio-ju%C3%A1rez-mart%C3%ADn-delgado>

### Situación profesional actual

**Entidad empleadora:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad

**Departamento:** Microbiología I (Inmunología), Facultad de Medicina

**Categoría profesional:** Investigador Predoctoral

**Fecha de inicio:** 01/02/2017

**Régimen de dedicación:** Tiempo completo



## Formación académica recibida

### Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

- 1 Titulación universitaria:** Titulado Superior  
**Nombre del título:** Master en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina  
**Entidad de titulación:** UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**Tipo de entidad:** Universidad  
**Fecha de titulación:** 2015
- 2 Titulación universitaria:** Titulado Superior  
**Nombre del título:** Graduado o Graduada en Biología  
**Entidad de titulación:** UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**Tipo de entidad:** Universidad  
**Fecha de titulación:** 2014

## Actividad docente

### Formación académica impartida

- 1 Nombre de la asignatura/curso:** Biología Celular e Inmunología  
**Titulación universitaria:** Grado en Nutrición Humana y Dietética  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid  
**Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Facultad de Medicina  
**Fecha de inicio:** 2019  
**Fecha de finalización:** 2020
- 2 Tipo de docencia:** Docencia oficial  
**Nombre de la asignatura/curso:** Prácticas de Inmunología  
**Tipo de programa:** Licenciatura  
**Tipo de docencia:** Prácticas de Laboratorio  
**Tipo de asignatura:** Obligatoria  
**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Medicina  
**Curso que se imparte:** Primero  
**Tipo de horas/créditos ECTS:** Horas  
**Nº de horas/créditos ECTS:** 18  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid  
**Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)  
**Departamento:** Inmunología  
**Fecha de inicio:** 2018  
**Fecha de finalización:** 2019  
**Idioma de la asignatura:** Español



- 3** **Nombre de la asignatura/curso:** Biología Celular e Inmunología  
**Titulación universitaria:** Grado en Nutrición Humana y Dietética  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Facultad de Medicina  
**Fecha de inicio:** 2018 **Fecha de finalización:** 2019
- 4** **Tipo de docencia:** Docencia oficial  
**Nombre de la asignatura/curso:** Inmunología Aplicada  
**Tipo de programa:** Licenciatura **Tipo de docencia:** Proyecto de Innovación Docente  
**Tipo de asignatura:** Optativa  
**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Bioquímica  
**Curso que se imparte:** Cuarto  
**Tipo de horas/créditos ECTS:** Horas  
**Nº de horas/créditos ECTS:** 10  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)  
**Departamento:** Inmunología  
**Fecha de inicio:** 2017 **Fecha de finalización:** 2018  
**Idioma de la asignatura:** Español
- 5** **Tipo de docencia:** Docencia oficial  
**Nombre de la asignatura/curso:** Prácticas de Inmunología  
**Tipo de programa:** Licenciatura **Tipo de docencia:** Prácticas de Laboratorio  
**Tipo de asignatura:** Obligatoria  
**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Medicina  
**Curso que se imparte:** Primero  
**Tipo de horas/créditos ECTS:** Horas  
**Nº de horas/créditos ECTS:** 18  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)  
**Departamento:** Inmunología  
**Fecha de inicio:** 2017 **Fecha de finalización:** 2018  
**Idioma de la asignatura:** Español
- 6** **Tipo de docencia:** Docencia oficial  
**Nombre de la asignatura/curso:** Prácticas de Inmunología  
**Tipo de programa:** Licenciatura **Tipo de docencia:** Prácticas de Laboratorio  
**Tipo de asignatura:** Obligatoria  
**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Medicina  
**Curso que se imparte:** Primero  
**Tipo de horas/créditos ECTS:** Horas  
**Nº de horas/créditos ECTS:** 16  
**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)  
**Departamento:** Inmunología  
**Ciudad entidad realización:** Madrid, Comunidad de Madrid, España



**Fecha de inicio:** 2016**Fecha de finalización:** 2017**Idioma de la asignatura:** Español**7 Tipo de docencia:** Docencia oficial**Nombre de la asignatura/curso:** Prácticas de Inmunología**Tipo de programa:** Licenciatura**Tipo de docencia:** Prácticas de Laboratorio**Tipo de asignatura:** Obligatoria**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Medicina**Curso que se imparte:** Primero**Tipo de horas/créditos ECTS:** Horas**Nº de horas/créditos ECTS:** 20**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid**Tipo de entidad:** Universidad**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)**Departamento:** Inmunología**Ciudad entidad realización:** Madrid, Comunidad de Madrid, España**Fecha de inicio:** 2015**Fecha de finalización:** 2016**Idioma de la asignatura:** Español**8 Tipo de docencia:** Docencia oficial**Nombre de la asignatura/curso:** Prácticas de Inmunología**Tipo de programa:** Licenciatura**Tipo de docencia:** Prácticas de Laboratorio**Tipo de asignatura:** Obligatoria**Titulación universitaria:** Graduado o Graduada en Medicina**Curso que se imparte:** Primero**Tipo de horas/créditos ECTS:** Créditos**Nº de horas/créditos ECTS:** 1,6**Entidad de realización:** Universidad Complutense de Madrid**Tipo de entidad:** Universidad**Facultad, instituto, centro:** Departamento de Medicina (UCM)**Departamento:** Inmunología**Ciudad entidad realización:** Madrid, Comunidad de Madrid, España**Fecha de inicio:** 2014**Fecha de finalización:** 2015**Idioma de la asignatura:** Español





## Experiencia científica y tecnológica

### Actividad científica o tecnológica

#### Proyectos de I+D+i financiados en convocatorias competitivas de Administraciones o entidades públicas y privadas

**Nombre del proyecto:** HLA-G: Cáncer Gástrico y su evolución

**Entidad de realización:** FUNDACION GENERAL DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Ciudad entidad realización:** Madrid, Comunidad de Madrid, España

**Nombres investigadores principales (IP, Co-IP,...):** José Manuel Martín Villa

**Nº de investigadores/as:** 7

**Entidad/es financiadora/s:**

Instituto de Salud Carlos III

**Tipo de entidad:** Organismo Público de Investigación

**Ciudad entidad financiadora:** Majadahonda, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de inicio:** 01/01/2019

**Cuantía total:** 124.630 €

## Actividades científicas y tecnológicas

### Producción científica

#### Publicaciones, documentos científicos y técnicos

- 1 Takayuki Katsuyama; Ignacio Juarez Martín-Delgado; Suzanne M Krishfield; Vasileios C Kyttaris; Vaishali R Moulton. Splicing factor SRSF1 controls T cell homeostasis and its decreased levels are linked to lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Rheumatology. 8, pp. 2146 - 2155. Oxford Academic, 01/08/2020.

**Tipo de producción:** Artículo científico

**Tipo de soporte:** Revista

**Autor de correspondencia:** No

- 2 Antonio Arnaiz-Villena; Ana Carballo; Ignacio Juarez; Ester Muñiz; Cristina Campos; Beatriz Tejedor; Manuel Martín-Villa; Jose Palacio-Gruber. HLA Genes in Atlantic Celtic populations: Are Celts Iberians?. International Journal of Modern Anthropology. 1 - 10, Association Tunisienne d'Anthropologie, 25/04/2017.

**Tipo de producción:** Artículo científico

**Tipo de soporte:** Revista

- 3 Ignacio Juárez Martín-Delgado; Ángel Luis Castaño. Informe sobre SIMPOSIUM "Microbiota". Revista Inmunología. 35 - 2, pp. 18 - 19. Publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología, 2016.

**Tipo de producción:** Reseña

**Tipo de soporte:** Revista

- 4 Antonio Arnaiz Villena; Jose Palacio Grüber; Ignacio Juarez; Ennio Hernández; Ester Muñiz; Brayan Bayona; Cristina Campos; Jorge Nieto; Manuel Martín Villa; Carlos Silvera. HLA in North Colombia Chimila Amerindians. Human immunology. 79 - 4, pp. 189 - 190. 04/2018. ISSN 1879-1166

**DOI:** 10.1016/j.humimm.2018.02.004

PMID: 29454071

- 5** Antonio Arnaiz Villena; Jose Palacio Gruber; Mercedes Enriquez de Salamanca; Ignacio Juárez; Cristina Campos; Jorge Nieto; Ester Muñiz; Jose Manuel Martín Villa. HLA-G, -A haplotypes in Amerindians (Ecuador): HLA-G\*01:05N World distribution. Human immunology. 79 - 2, pp. 89 - 90. 02/2018. ISSN 1879-1166  
DOI: 10.1016/j.humimm.2017.12.002  
PMID: 29217368
- 6** Antonio Arnaiz Villena; Brayan Bayona; Jose Palacio Gruber; Ennio Hernández; Ester Muñiz; Cristina Campos; Ignacio Juárez; Eduardo Gomez Casado; Jose Manuel Martín Villa; Carlos Silvera. HLA genes in Barranquilla (North Colombia): Searching for cryptic Amerindian genes. Human immunology. 79 - 1, pp. 3 - 4. 01/2018. ISSN 1879-1166  
DOI: 10.1016/j.humimm.2017.11.003  
PMID: 29129648

### Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

- 1** **Título del trabajo:** Elevada expresión de PD1 en linfocitos T CD8 y expresión diferencial de PDL1 en tejido tumoral y sano en pacientes con adenocarcinoma gástrico  
**Nombre del congreso:** V Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (FIT-CÁNCER 4)  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 07/03/2019  
**Fecha de finalización:** 09/03/2019  
**Entidad organizadora:** Grupo Español de Terapias **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones Inmuno-Biológicas en Cáncer (GÉTICA)  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzué; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.
- 2** **Título del trabajo:** HIGH EXPRESSION OF PD1 ON T CD8 LYMPHOCYTES AND DIFFERENTIAL EXPRESSION OF PDL1 IN HEALTHY TUMOR TISSUE IN PATIENTS WITH GASTRIC ADENOCARCINOMA  
**Nombre del congreso:** IX Jornada de la SICAM  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 18/01/2019  
**Fecha de finalización:** 18/01/2019  
**Entidad organizadora:** SICAM **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Ignacio Juárez Martín-Delgado.
- 3** **Título del trabajo:** Análisis fenotípico y funcional de poblaciones linfoides de sangre periférica, mucosa sana y tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico.  
**Nombre del congreso:** II Edición PhDay-Facultad de Medicina  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 22/06/2018  
**Fecha de finalización:** 22/06/2018  
**Entidad organizadora:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad



Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.

- 4** **Título del trabajo:** Análisis fenotípico y funcional de poblaciones linfoides de sangre periférica, mucosa sana y tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico.  
**Nombre del congreso:** IV Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (FIT-CÁNCER 4)  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 08/03/2018  
**Fecha de finalización:** 10/03/2018  
**Entidad organizadora:** Grupo Español de Terapias Inmuno-Biológicas en Cáncer (GÉTICA) **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.
- 5** **Título del trabajo:** Evaluación de las amplificaciones del gen HER2 en muestras pareadas tumorales/no-tumorales de adenocarcinoma gástrico mediante métodos de genética molecular  
**Nombre del congreso:** 1ª Jornada PhDay-Biomedicina  
**Tipo de participación:** Participativo - Póster  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 09/06/2017  
**Fecha de finalización:** 09/06/2017  
**Entidad organizadora:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.
- 6** **Título del trabajo:** Assessment of HER2 amplification in paired tumoural/non-tumoural gastric adenocarcinoma samples by reliable molecular biology methods  
**Nombre del congreso:** 40 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Zaragoza, Aragón, España  
**Fecha de celebración:** 25/05/2017  
**Fecha de finalización:** 27/05/2017  
**Entidad organizadora:** SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.
- 7** **Título del trabajo:** Characterization of PD-1 expression on lymphocytes of gastric adenocarcinoma patients  
**Nombre del congreso:** 40 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Zaragoza, Aragón, España  
**Fecha de celebración:** 25/05/2017  
**Fecha de finalización:** 27/05/2017  
**Entidad organizadora:** SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.

- 8 Título del trabajo:** HER2 overexpression could give way to Trastuzumab treatment for gastric adenocarcinoma  
**Nombre del congreso:** Simposio Avances y Perspectivas en Inmunoterapia  
**Tipo de participación:** Participativo - Póster  
**Autor de correspondencia:** Si  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 19/05/2017  
**Fecha de finalización:** 19/05/2017  
**Entidad organizadora:** FUNDACION CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES CARLOS III  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzue; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa.
- 9 Título del trabajo:** HER-2 overexpression could give way to Trastuzumab treatment in gastric adenocarcinoma  
**Nombre del congreso:** VII Jornada de SICAM  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 18/11/2016  
**Fecha de finalización:** 18/11/2016  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Inmunología  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutierrez Calvo; José Manuel Martín Villa.
- 10 Título del trabajo:** LOS POLIMORFISMOS DEL GEN TGFB1 PODRÍAN IDENTIFICAR ALTO RIESGO DE METÁSTASIS Y UNATASA DE SUPERVIVENCIA BAJA EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO  
**Nombre del congreso:** VII Jornada de SICAM  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 18/11/2016  
**Fecha de finalización:** 18/11/2016  
**Entidad organizadora:** Sociedad Española de Inmunología  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutierrez Calvo; José Manuel Martín Villa.
- 11 Título del trabajo:** HER-2 overexpression could give way to Trastuzumab treatment in gastric adenocarcinoma  
**Nombre del congreso:** 1st Annual European Congress of Immunotherapies in Cancer  
**Ciudad de celebración:** Barcelona, Cataluña, España  
**Fecha de celebración:** 23/09/2016  
**Fecha de finalización:** 24/09/2016  
**Entidad organizadora:** Physicians' Education Resource  
**Ciudad entidad organizadora:** Nueva Jersey, Estados Unidos de América  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Juan Francisco Toro Fernández; Alberto Gutierrez Calvo; José Manuel Martín Villa.
- 12 Título del trabajo:** TGF- $\beta$ 1 Polymorphisms may identify gastric adenocarcinoma patients with high risk of metastasis and a lower survival rate  
**Nombre del congreso:** 39 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) 2016  
**Ciudad de celebración:** Alicante, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 07/05/2016

**Fecha de finalización:** 07/05/2016

**Entidad organizadora:** SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGIA

**Ciudad entidad organizadora:** España

Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto José Gutiérrez Calvo; Alma Blázquez Martín; Enrique Ovejero Merino; Inmaculada Lasa Unzué; Adela López García; Remedios Gómez Sanz; José Manuel Martín Villa. "TGF- $\gamma$ 1 Polymorphisms may identify gastric adenocarcinoma patients with high risk of metastasis and a lower survival rate".

- 13 Título del trabajo:** Los polimorfismos del TGF- $\gamma$ 1 podrían identificar pacientes con adenocarcinoma gástrico con alto riesgo de metástasis y menor tasa de supervivencia  
**Nombre del congreso:** II Foro de Inmunología Traslacional e Inmunoterapia del Cáncer (FIT-CANCER II) 2016  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Sevilla, Andalucía, España  
**Fecha de celebración:** 11/03/2016  
**Fecha de finalización:** 11/03/2016  
**Entidad organizadora:** El Grupo Español de Terapias Inmuno-Biológicas en Cáncer (GÉTICA) **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
**Ciudad entidad organizadora:** España  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutierrez Calvo; A. Blazquez; E. Ovejero; I. Lasa; A. Lopez; R. Gomez; José Manuel Martín Villa. "Los polimorfismos del TGF- $\gamma$ 1 podrían identificar pacientes con adenocarcinoma gástrico con alto riesgo de metástasis y menor tasa de supervivencia".
- 14 Título del trabajo:** Los polimorfismos del TGF- $\gamma$ 1 podrían identificar pronóstico de metástasis en pacientes con adenocarcinoma gástrico  
**Nombre del congreso:** IV Jornada de la Sociedad de Inmunología de la comunidad de Madrid (SICAM) 2015  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
**Fecha de celebración:** 06/09/2015  
**Fecha de finalización:** 09/09/2015  
**Entidad organizadora:** Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid  
**Ciudad entidad organizadora:** Madrid, Comunidad de Madrid, España  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutierrez; A. Blazquez; E. Ovejero; I. Lasa; A. Lopez; R. Gomez; José Manuel Martín Villa. "Los polimorfismos del TGF- $\gamma$ 1 podrían identificar pronóstico de metástasis en pacientes con adenocarcinoma gástrico".
- 15 Título del trabajo:** TGF- $\gamma$ 1 polymorphisms may identify metastasis-prone patients with gastric adenocarcinoma  
**Nombre del congreso:** European Congress of Immunology 2015 (ECI 2015)  
**Autor de correspondencia:** No  
**Ciudad de celebración:** Vienna, Austria  
**Fecha de celebración:** 06/09/2015  
**Fecha de finalización:** 09/09/2015  
**Entidad organizadora:** EFIS - European Federation of Immunological Societies [www.efis.org](http://www.efis.org) **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones  
Ignacio Juárez Martín-Delgado; Alberto Gutierrez; A. Blazquez; E. Ovejero; I. Lasa; A. Lopez; R. Gomez; José Manuel Martín Villa.





## Otros méritos

### Estancias en centros de I+D+i públicos o privados

- 1** **Entidad de realización:** Harvard University **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Harvard Medical School - Beth Israel Deaconess Medical Center  
**Ciudad entidad realización:** Boston, Estados Unidos de América  
**Fecha de inicio-fin:** 20/02/2020 - 20/05/2020 **Duración:** 3 meses  
**Objetivos de la estancia:** Doctorado/a  
**Tareas contrastables:** Estancia de Investigación Predoctoral de tres meses.
- 2** **Entidad de realización:** Harvard University **Tipo de entidad:** Universidad  
**Facultad, instituto, centro:** Harvard Medical School - Beth Israel Deaconess Medical Center  
**Ciudad entidad realización:** Boston, Estados Unidos de América  
**Fecha de inicio-fin:** 24/06/2019 - 27/09/2019 **Duración:** 3 meses  
**Objetivos de la estancia:** Doctorado/a  
**Tareas contrastables:** Estancia de Investigación Predoctoral de tres meses.

### Ayudas y becas obtenidas

**Nombre de la ayuda:** Ayudas para contratos predoctorales de personal investigador en formación - Real Colegio de Harvard  
**Finalidad:** Predoctoral  
**Entidad concesionaria:** Universidad Complutense de Madrid **Tipo de entidad:** Universidad  
**Fecha de concesión:** 01/02/2017 **Duración:** 4 años  
**Fecha de finalización:** 01/02/2021  
**Entidad de realización:** Departamento de Microbiología I (UCM)  
**Facultad, instituto, centro:** Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

# A reliable and standardizable DNA-based methodology assesses HER2 genetic amplification in tumoral, but not distal, tissue in patients with gastric adenocarcinoma

Ignacio Juárez<sup>1</sup>, Christian Vaquero-Yuste<sup>1</sup>, Juan F. Toro-Fernández<sup>1</sup>, Adela López<sup>2</sup>, Inmaculada Lasa<sup>2</sup>, José Manuel Martín-Villa<sup>1, 3\*</sup>, Alberto Gutierrez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain, <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Spain, <sup>3</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Spain

*Submitted to Journal:*  
Pathology and Oncology Research

*Article type:*  
Original Research Article

*Manuscript ID:*  
609021

*Received on:*  
22 Sep 2020

*Frontiers website link:*  
[www.frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)

**TGFB1 polymorphisms and TGF- $\beta$ 1 plasma levels identify gastric adenocarcinoma patients with lower survival rate and disseminated disease**

Journal:	<i>Journal of Cellular and Molecular Medicine</i>
Manuscript ID	JCMM-05-2020-064
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	06-May-2020
Complete List of Authors:	Juarez, Ignacio; Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina, Inmunologia Gutierrez-Calvo, Alberto; Hospital Universitario Principe de Asturias Vaquero-Yuste, Christian; Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina Lopez, Adela; Hospital Universitario Principe de Asturias Lasa, Inmaculada; Hospital Universitario Principe de Asturias Gomez, Remedios; Hospital Universitario Principe de Asturias Martin-Villa, Jose; Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina, Inmunologia; Gregorio Maranon Health Research Institute,
Keywords:	Gastric Cancer, TGF-beta, SNPs, Metastasis
Abstract:	<p>TGF-<math>\beta</math>1 is involved in tumor growth. Four TGFB1 SNPs and TGF-<math>\beta</math>1 production by stimulated PBMC were determined in seventy-eight gastric adenocarcinoma patients. In addition, TGF-<math>\beta</math>1 levels were measured in the plasma of further thirty patients.</p> <p>rs1800471-G/C genotype was prevalent in patients (20.7%) compared to controls (8.4%), as it also was the rs1800468 SNP-G/A genotype in stage IV patients (20.7%) compared to stage I, II and III patients, combined (10.3%). Conversely, the T/T rs1800469 SNP-T/T genotype was absent in the former group and present in 19.0% in the latter. Furthermore, the rs1800469-C/rs1800470-T (CT) haplotype was found in 15.0% of stage IV patients as compared to 3.0% of the remaining patients (3.0%) and also identifies patients with worse five-year life expectancy (<math>p=0.03</math>).</p> <p>TGF-<math>\beta</math>1 synthesis by stimulated PBMCs was significantly lower in patients with the risk SNPs or haplotype, compared to the alternative genotype. Finally, TGF-<math>\beta</math>1 plasma levels were lower in patients with worse life expectancy.</p> <p>Analysis of TGFB1 SNPs and measurement of plasma TGF-<math>\beta</math>1 levels serves to identify patients at risk of developing a more aggressive disease.</p>



## Journal of Cellular and Molecular Medicine

**Decision Letter (JCMM-05-2020-064.R1)**

**From:** JCMMEditorial@wiley.com

**To:** autoinmu@ucm.es, jmmvilla@ucm.es

**CC:** ignajuar@ucm.es, agutierrezcalvo@telefonica.net, cvaque01@ucm.es, emolanes@ucm.es, aplopezgarcia@gmail.com, ilasau@gmail.com, rgomezsanaz@yahoo.es, autoinmu@ucm.es, jmmvilla@ucm.es

**Subject:** Journal of Cellular and Molecular Medicine - Decision on Manuscript ID JCMM-05-2020-064.R1

**Body:** 06-Nov-2020

Dear Dr. Martin-Villa:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "TGFB1 polymorphisms and TGF- $\beta$ 1 plasma levels identify gastric adenocarcinoma patients with lower survival rate and disseminated disease" in its current form for publication in the Journal of Cellular and Molecular Medicine. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The editorial staff will now check your manuscript and you may be asked to make a few changes to ensure that it is ready for production. Once this is completed the production team will typeset and copyedit your manuscript and will get in touch with you shortly for the proofreading stage. If you have further questions once you have received your proofs, or after your article is published, please contact the Production Editor at aapuya@wiley.com.

Due to the high number of already accepted papers your accepted manuscript could wait at least half a year to be scheduled for inclusion in a regular issue. However, articles are published in Early View before being included in an issue.

Please note that your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Once your article has been received by Wiley for production the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion. For further questions about Open Access Agreements, please see <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/licensing/open-access-agreements.html> or contact cs-author@wiley.com.

Payment of your Open Access Article Publication Charge (APC):

All articles published in Journal of Cellular and Molecular Medicine are fully open access: immediately and freely available to read, download and share. Journal of Cellular and Molecular Medicine charges an article publication charge (APC).

Before we can publish your article, your payment must be completed.

All articles published in Journal of Cellular and Molecular Medicine are fully open access: immediately and freely available to read, download and share. Journal of Cellular and Molecular Medicine charges a publication fee to cover the publication costs. The corresponding author for this manuscript should have already received a quote with the estimated article publication fee when the manuscript was checked after initial submission; please contact cs-openaccess@wiley.com if you did not receive this. Once your accepted paper is in production, the corresponding author will receive an e-mail inviting them to register with or log in to Wiley Author Services ([www.wileyauthors.com](http://www.wileyauthors.com)) where the publication fee can be paid by credit card, or an invoice or proforma can be requested. The option to pay via credit card and claim reimbursement from your institution may help to avoid delays with payment processing.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Cellular and Molecular Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Journal of Cellular and Molecular Medicine  
JCMMEditorial@wiley.com

P.S. – You can help your research get the attention it deserves! Wiley Editing Services offers professional video abstract and infographic creation to help you promote your research at [www.wileyauthors.com/eoo/promotion](http://www.wileyauthors.com/eoo/promotion). And, check out Wiley's free Promotion Guide for best-practice recommendations for promoting your work at [www.wileyauthors.com/eoo/guide](http://www.wileyauthors.com/eoo/guide).

## Editor Comments to Author:

Editor

Comments to the Author:  
(There are no comments.)

## Reviewer(s)' Comments to Author:


Reviewer: 1

Comments to the Author  
My issues are all addressed.

Reviewer: 2

Comments to the Author

I would like to congratulate the authors for the revised version of their work. The response and the corrections increase the understanding and the quality of the paper, clarifying all raised aspects. In my opinion the revised manuscript is suitable for publication.

**Date Sent:** 06-Nov-2020 Close Window